

MARCELO CALIDE BARGA

MODELO DE INFERÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DA UMIDADE
DO LEITO DE UM BIORREATOR PILOTO DE FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO.

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Área de
concentração: Engenharia de Processos
Térmicos e Químicos, Programa
Interdisciplinar de Pós-Graduação em
Engenharia – PIPE. Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Luz Jr.

Curitiba
2007

MARCELO CALIDE BARGA

MODELO DE INFERÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DA UMIDADE
DO LEITO DE UM BIORREATOR PILOTO DE FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO.

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Área de
concentração: Engenharia de Processos
Térmicos e Químicos, Programa
Interdisciplinar de Pós-Graduação em
Engenharia – PIPE. Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Luz Jr.

Curitiba
2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ajudar nos momentos difíceis durante todo o meu caminho, principalmente na realização de experimentos em escala piloto que pareciam quase impossíveis de tão desafiadoras que eram num primeiro momento.

Foi esse desafio que me deu motivação para trabalhar em cima desse projeto que para mim retrata a dedicação de meus pais, Neusa Calide Barga e Arnaldo Torres Barga. Agradeço a essas duas pessoas que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, sendo os professores mais importantes que tive durante toda a minha vida, que me ensinaram muitas coisas nesse decorrer, dentre elas a importância da família.

Aos meus orientadores David Alexander Mitchell e Luiz Fernando Lima Luz Jr. pelos ensinamentos durante a minha vida acadêmica, tanto tecnicamente como profissionalmente. Agradeço também pela paciência na elaboração desse trabalho e pelas conversas sobre problemas rotineiros da vida, sendo para mim pessoas que tenho como exemplo.

Em relação à paciência, agradeço também a minha namorada Nádia Bono Gonçalves por entender minha ausência durante esse período, pelo carinho e compreensão que tanto me ajudaram em momentos difíceis.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Engenharia (PIPE), pelo fomento e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Em relação aos trabalhos desenvolvidos experimentalmente agradeço meus amigos Wellington Balmant, Ricardo Suzuki, Renato Segui, Giuseppe Biondi e Rodrigo Galvez pelo seu companheirismo e dedicação. Agradeço também aos colegas do laboratório de fermentação no estado sólido Graciele Viccini, Marcelo Muller, Rodrigo Faria e Vivian Moure pelas discussões sobre o projeto e pela amizade durante todo esse tempo.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
SÍMBOLOS GREGOS.....	XIII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Objetivo e Estratégia	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Características Gerais da Fermentação em Estado Sólido	6
2.2. Biorreatores de FES	8
2.2.1. Descrições dos Biorreatores	9
2.2.1.1. Biorreator com Agitação Ocasional, sem Aeração Forçada	9
2.2.1.2. Biorreator com Agitação Contínua, sem Aeração Forçada.....	10
2.2.1.3. Biorreator com Aeração Forçada sem Agitação ou com Agitação Ocasional ..	11
2.2.1.4. Biorreator com Agitação Contínua e com Aeração Forçada.....	12
2.2.2. Modelos Matemáticos para Biorreatores	13
2.2.2.1. Biorreatores com Agitação Ocasional, sem Aeração Forçada.	13
2.2.2.2. Biorreatores com Agitação Contínua Lenta, sem Aeração Forçada.....	13
2.2.2.3. Biorreatores com Aeração Forçada, sem Agitação ou com Agitação Ocasional	14
2.2.2.4. Biorreatores com Agitação Frequente e com Aeração Forçada	15
2.3. Cinética de Crescimento do Microrganismo	16
2.4. Monitoramento e Controle da Fermentação em Estado Sólido	16
2.4.1. Variáveis do Processo	17
2.4.2. Monitoramento <i>On-Line</i> através de Instrumentos	19
2.4.3. Filtro de Dados	21
2.4.4. Método de Inferência (<i>Soft-Sense</i>).....	23

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Meio de Cultivo	25
3.2. Microrganismo.....	25
3.2.1. Manutenção do Microrganismo	25
3.3. Produção do Inóculo para o Biorreator	26
3.4. Contagem de Esporos.....	27
3.5. Determinação da Umidade	28
3.6. Experimento para Determinação da Isoterma do Substrato	29
3.7. Determinação do Calor Específico do Substrato.....	31
3.8. Densidade do Substrato	32
3.9. Porosidade do Leito do Substrato	33
3.10. Procedimentos Operacionais Padrão.....	34
3.11. Processo de Cultivo do Fungo <i>R. oryzae</i> em Biorreator de Escala Piloto	34
3.11.1. Sistema de Aeração e Umidificação do Ar	34
3.11.1.1. Limpeza do Sistema de Umidificação	36
3.11.2. Descrição do Biorreator de Escala Piloto.....	36
3.11.2.1. Esterilização do Biorreator.....	37
3.11.3. Instrumentos e Sistema para Aquisição de Dados	37
3.11.3.1. Posicionamento e Calibração dos Termopares no Leito do Biorreator	38
3.11.3.2. Ambiente e Sistema para Aquisição de Dados.....	39
3.11.4. Cultivo do Fungo <i>R. oryzae</i> no Biorreator de Escala Piloto	42
3.11.4.1. Preparo do Substrato	42
3.11.4.2. Inoculação do Substrato	43
3.11.4.3. Monitoramento Experimental da Umidade e Temperatura do Leito	43
3.11.4.4. Agitação do Biorreator.....	45
4. DESENVOLVIMENTO DO MODELO MATEMÁTICO.....	46
4.1. Filtro de Dados	46
4.1.1. Filtro 1 - Eliminação de Medições em um mesmo Tempo	46
4.1.2. Filtro 2 - Eliminação de Variações de Temperatura Menores que a Precisão dos Termopares.....	46
4.1.3. Filtro 3 - Filtro Exponencial.....	47
4.1.4. Filtro 4 - Média Móvel.....	48
4.2. Descrição do Modelo de Inferência	51

4.3. Fenômenos de Transferência de Calor e Massa	53
4.3.1. Balanço de Energia Global.....	53
4.3.2. Cálculo do Consumo de Oxigênio e Produção de Gás Carbônico	56
4.3.3. Cálculo da Produção de Água pelo Microrganismo	57
4.3.4. Balanço de Sólidos Secos.....	58
4.3.5. Atividade de Água para a Fase Sólida	59
4.3.6. Atividade de Água para a Fase Gasosa	60
4.3.7. Balanço de Água Global	61
4.2.8. Sistema de Equações.....	62
4.2.9. Condições Iniciais	64
4.2.10. Condições de Contorno	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1. Otimização da Produção de Esporos.....	66
5.2. Isotermas dos Substratos em Diferentes Temperaturas	67
5.2.1. Isoterma da Soja em Diferentes Temperaturas.....	67
5.2.2. Isoterma do Trigo em Diferentes Temperaturas	69
5.3. Calor Específico do Substrato	70
5.4. Determinação das Densidades dos Substratos.....	72
5.5. Resultados dos Experimentos Realizados no Biorreator	73
5.5.1. Cultivo do Fungo <i>R. oryzae</i> em Soja	73
5.5.1.1. Experimento 1	73
5.5.1.2. Experimento 2	77
5.5.2. Cultivo do Fungo <i>R. oryzae</i> em Trigo Moído	82
5.5.2.1. Experimento 1	82
5.5.2.2. Experimento 2	86
5.6. Análise de Sensibilidade do Modelo.....	93
6. CONCLUSÃO	96
7. SUGESTÕES E TRABALHOS FUTUROS	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO I.....	110
ANEXO II	128

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Características gerais de (A) biorreatores de FES e (B) estrutura do leito de substrato.	7
FIGURA 2. Esquema do biorreator em bandejas. O ar deve ser injetado preferencialmente no fundo do biorreator e circula ao redor das bandejas que contém o substrato.....	9
FIGURA 3. Esquema do biorreator de tambor rotativo.	10
FIGURA 4. Esquema do biorreator de tambor agitado através de pás. Um motor gira a haste que contém as pás que misturam o substrato.....	10
FIGURA 5. Esquema do biorreator de leito fixo. O ar é injetado no fundo do biorreator passando através do leito do substrato.	11
FIGURA 6 - Biorreator Zymotis. O ar é injetado na base e passa através do leito. O leito do substrato fica entre placas onde é circulada água para o resfriamento do leito.....	12
FIGURA 7. Esquema do biorreator de leito mecanicamente agitado. O centro é agitado por um misturador mecânico enquanto o ar é injetado através do leito.....	12
FIGURA 8. Esquema do biorreator de leito fluidizado. O ar é injetado no fundo do biorreator em velocidade suficientemente alta para manter as partículas do substrato suspensas.	13
FIGURA 9. Esquema para manutenção do fungo <i>R. oryzae</i>	26
FIGURA 10. Procedimento para otimização da produção de esporos	27
FIGURA 11. Câmara de NeuBauer	27
FIGURA 12. Contagem de esporos na câmara de NeuBauer em "zig-zag"	28
FIGURA 13. Materiais utilizados na determinação da isoterma.	30
FIGURA 14. Experimento para determinação da porosidade.	33
FIGURA 15. Sistema de filtração do ar	34
FIGURA 16. Sistema de umificação do ar.....	35
FIGURA 17. Representação do biorreator.....	36
FIGURA 18. Disposição dos módulos de termopares no biorreator na vertical	38
FIGURA 19. (•) Disposição dos termopares no biorreator ao longo do eixo horizontal	38
FIGURA 20. Tela principal do programa de aquisição de dados.....	40
FIGURA 21. Gráficos dos resultados de monitoramento do ar de entrada e saída.	40
FIGURA 22. Gráfico das temperaturas obtidas de cada termopar.	41
FIGURA 23. Configuração de endereço e calibração dos sensores.	41

FIGURA 24. Inoculação dos esporos no biorreator	43
FIGURA 25. Seqüência de coleta de amostra para uma mesma posição.	44
FIGURA 26. Coleta da amostra.....	44
FIGURA 27. Fluxograma dos filtros de dados em série.	50
FIGURA 28. Fenômenos de transporte de energia e massa que ocorrem no sistema.	52
FIGURA 29. Esquema de utilização dos balanços de massa e energia para estimar a umidade do leito a partir das temperaturas medidas <i>on-line</i>	53
FIGURA 30. Isoterma da soja em diferentes temperaturas. (□) umidade a 35 °C, (—) modelo a 35°C, (○) umidade a 45 °C, (- - -) modelo a 45 °C, (Δ) umidade a 55 °C, (— - —) modelo a 55 °C.....	68
FIGURA 31. Isoterma do trigo moído em diferentes temperaturas. (□) umidade a 35 °C, (—) modelo a 35°C, (○) umidade a 45 °C, (- - -) modelo a 45 °C, (Δ) umidade a 55 °C, (— - —) modelo a 55 °C.	69
FIGURA 32. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.	75
FIGURA 33. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (○) umidade a 33 cm, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. R = 0,86.	76
FIGURA 34. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.	79
FIGURA 35. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (□) umidade a 5 cm, (—) umidade pelo modelo a 5 cm. R = 0,19.....	80
FIGURA 36. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (○) umidade a 10-20 cm, (—) umidade pelo modelo a 18 cm. R = 0,85.....	80
FIGURA 37. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (Δ) umidade a 25-30 cm, (◇)umidade a 30 - 35 cm, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. R = 0,67.....	81
FIGURA 38. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.	84
FIGURA 39. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (○) umidade a 33 cm, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. R = 0,33.	85

FIGURA 40. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (□) temperatura a 5 cm, (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.	88
FIGURA 41. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (□) umidade a 0-5 cm, (○)umidade a 5-10 cm, (—) umidade pelo modelo a 5 cm. R = 0,41.....	89
FIGURA 42. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (□) umidade a 10-15 cm, (○)umidade a 15-20 cm, (—) umidade pelo modelo a 18 cm. R = 0,82.....	89
FIGURA 43. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (□) umidade a 20-25 cm, (○)umidade a 25-30 cm, (Δ) umidade a 30-35 cm, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. R = 0,40.	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores de amostragem de variáveis no tempo.	23
TABELA 2. Atividades de água de soluções insaturadas de NaCl para diferentes concentrações: valores propostos como padrões na faixa de 15-65°C.	29
TABELA 3. Concentração de esporos nas soluções A, B e C.	66
TABELA 4. Valores das constantes da equação da isoterma para soja (Eq. (30), seção 4.8).	68
TABELA 5. Valores das constantes da equação da isoterma para o trigo moído (Eq. (30), seção 4.8).	70
TABELA 6. Calor específico para a soja.	70
TABELA 7. Calor específico para o trigo moído.	71
TABELA 8. Densidades calculadas para a soja bipartida e para o trigo moído.	72
TABELA 9. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 1 com soja.	74
TABELA 10. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 2 com soja.	78
TABELA 11. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 1 com trigo moído.	83
TABELA 12. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 2 com trigo moído.	87
TABELA 13. Avaliação da sensibilidade do modelo em relação a variações da isoterma da soja.	94
TABELA 14. Avaliação da sensibilidade do modelo em relação a variações da isoterma do trigo.	95

LISTA DE SÍMBOLOS

a_{wg} = atividade de água da fase gasosa;

C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 = constantes que serão determinadas através dos experimentos por regressão multivariável.

c_{pg} = calor específico do ar seco ($J \cdot kg^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}$);

c_{ps} = calor específico do substrato seco ($J \cdot kg^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}$);

$c_{ps\ úmido}$ = calor específico do substrato úmido ($J \cdot kg^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}$);

c_{pv} = calor específico do vapor de água ($J \cdot kg^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}$);

c_{pw} = calor específico da água ($J \cdot kg^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}$);

G = fluxo mássico de ar ($kg\text{-}ar \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$);

H_{sat} = umidade de saturação ($kg\text{-}água \cdot kg\text{-}ar^{-1}$);

$m_{s\ úmido}$ = massa do substrato úmido (kg);

m_w = massa da água (kg);

MCO_2 = massa molar do gás carbônico ($44g \cdot mol^{-1}$);

MH_2O = massa molar da água ($18 g \cdot mol^{-1}$);

P = pressão da fase gasosa (Pa)

P_w^{sat} = pressão parcial de saturação da fase gasosa (Pa).

Q = calor metabólico ($J \cdot m^{-3}$);

S = massa de substrato contido no leito ($kg\text{-}subst.\text{-}seco \cdot m^{-3}$);

T = temperatura de equilíbrio ($^\circ C$);

T_a = temperatura ambiente em que se encontrava a soja ($^\circ C$);

T_{eq} = temperatura final de equilíbrio ($^\circ C$);

$T_{f1}(t,z)$ = temperatura filtrada obtida do primeiro filtro ($^\circ C$);

$T_{f2}(t,z)$ = temperatura filtrada obtida do segundo filtro ($^\circ C$);

$T_{f3}(t,z)$ = temperatura filtrada obtida do terceiro filtro ($^\circ C$);

$T_{f4}(t,z)$ = temperatura filtrada obtida do quarto filtro ($^\circ C$);

T_g = temperatura da fase gasosa ($^\circ C$);

T_{quente} = temperatura da água quente (°C);

W = água produzida pelo metabolismo (kg - água . m⁻³);

x = volume de água acima do volume ocupado pelo leito de substrato (mL);

Y_{CO_2/O_2} = taxa de conversão do oxigênio em gás carbônico (mol CO₂ . mol⁻¹ O₂);

Y_{Q/O_2} = taxa de conversão em calor metabólico a partir do consumo de oxigênio (J. H₂O . mol⁻¹ O₂);

Y_{W/O_2} = taxa de conversão do oxigênio em água metabólica (mol H₂O . mol⁻¹ O₂);

z = altura do leito no biorreator (cm);

SÍMBOLOS GREGOS

φ_s^* = água contida na fase sólida quando em equilíbrio com a fase gasosa (kg-água . kg-substrato-seco⁻¹);

φ_s = umidade da fase sólida (kg - água . kg - subst. - seco⁻¹);

φ_g = umidade da fase gasosa (kg-água . kg-ar-seco⁻¹);

ε = porosidade do leito (m³-espaço-vazio . m⁻³);

λ = entalpia de evaporação da água (J . kg-água⁻¹);

ρ_g = densidade da fase gasosa (kg-ar-seco . m⁻³);

ρ_{su} = densidade do substrato úmido (kg-substrato-úmido . m⁻³);

RESUMO

O processo de fermentação no estado sólido (FES) tem sido usado como uma técnica em potencial para produzir alguns compostos microbianos com mais eficiência do que a fermentação submersa (FS). Por exemplo, em FES, a produção de esporos é mais elevada, os esporos são também mais infecciosos do que os esporos produzidos por FS e podem ser usados como biopesticidas. Entretanto, poucos processos foram estudados e aplicados industrialmente devido a problemas de otimização e controle. Este processo apresenta muitos problemas do controle tais como a dificuldade de controlar a temperatura e a umidade do leito de um biorreator piloto de FES. Conseqüentemente, para superar o aumento da temperatura em biorreatores em grande escala, pode ser aplicado o resfriamento evaporativo devido à remoção limitada do calor o que resulta em grandes perdas de umidade. Para manter a umidade necessária no leito, a umidade dos sólidos deve ser monitorada continuamente *on-line* para a adição de uma quantidade de água necessária para fornecer condições ótimas de crescimento. Embora, é difícil e caro ter uma medida *on-line* da umidade do leito. Então, este trabalho consistiu desenvolver um modelo dinâmico indireto que usasse a equação de balanço de massa e de energia para estimar a umidade do leito de um biorreator de escala piloto com aeração forçada e agitação intermitente a partir das temperaturas monitoradas *on-line* da fase sólida e da fase gasosa. Para utilização deste modelo, foi necessário determinar as propriedades dos substratos, consistindo em soja ou trigo moído, os quais foram utilizados em cada experimento de cultivo do fungo *Rhizopus oryzae*. As isotermas dos substratos usados nos experimentos foram ajustadas para diferentes temperaturas e a influência do conteúdo de biomassa não foi considerada. O modelo considera que ocorre equilíbrio da atividade de água e temperatura entre o ar interpartícula e as partículas do substrato dentro do leito, com a saturação da fase gasosa. Para os experimentos de cultivo do microrganismo em soja, foram obtidas correlações em relação as umidades previstas pelo modelo de aproximadamente 0,19 para a base do leito, 0,85 para o meio do leito. Nos experimentos utilizando trigo moído como substrato, a correlação entre as umidades experimentais e as obtidas a partir do modelo foi próxima a 0,40 para a base e topo do leito e de 0,82 para o meio do leito. Para os experimentos, o modelo superestimou as perdas de água. Durante as fases iniciais de cultivo o erro em relação às estimativas era menor e com erros maiores nos últimos estágios da fermentação, geralmente após misturar o leito. A suposição da saturação da fase gasosa ao longo do leito assumida pelo modelo não está completamente correta. Finalmente, este modelo pode ser utilizado na estimativa indireta da umidade do leito, mas deve ser validado com outros experimentos através do monitoramento das variáveis respirométricas que também são previstas pelo modelo. Algumas considerações feitas pelo modelo proposto devem ser revistas, como a saturação do leito, mas o método de inferência para a umidade do leito deve ser considerado como uma forma de estimar as variáveis-chaves do processo que não possuem sensores para um monitoramento *on-line* confiáveis.

ABSTRACT

Solid state fermentation (SSF) process has been used as a potential technique to produce some microbial compounds with more efficiency than submerged fermentation (SF). For example, the production in SSF is higher and the spores are also more virulent than SF and can be used as biopesticides. However, few processes have been studied and applied industrially because of optimization and control problems. Actually, this process has many control problems such as the difficulty of controlling the bed temperature and the moisture content of a pilot solid state bioreactor. Therefore, to overcome the increase of the temperature in large-scale solid state bioreactors, evaporative cooling has to be applied due to the limited heat removal and results in large moisture losses. To maintain the necessary water in the bed, the moisture content of the solids must be monitored continuously on-line for the addition of an amount of necessary water to give optimal conditions of growth. Although, it is difficult and expensive to measure the bed moisture content on-line. So, this work consisted to develop an indirect dynamic measurement model that used equation of mass and energy balances to estimate the moisture content of the bed of a pilot-scale bioreactor with forced aeration and intermittent agitation by the on-line monitored temperatures of solid and gas phase. In order to use this model, was necessary to determine the properties of the substrates, consisting by soybeans or grinded wheat grains, which were used in each experiment of cultivation of the fungi *Rhizopus oryzae*. The isotherms of the substrates used in the experiments were adjusted for different temperatures and didn't include the influence of biomass content. The model assumed the water activity and thermal equilibrium between the inter-particle air and the solid substrate particles within the bed, with the saturation of the gas phase. For the experiments which consisted the growth of the microorganism on soybeans, was obtained a correlation of 0,19 for the bottom of the bed and 0,85 for the middle of the bed, between the moisture content of the bed and the moisture content predicted by the model. For the experiments which used wheat grains as substrate, the correlation between the moisture content of the bed and the moisture predicted by the model was 0,40 for the bottom of the bed and 0,82 for the middle of the bed. For these experiments, the model overestimated the water losses. During latter phases the estimation error was smaller and increased in the earlier stages of the fermentation, generally after the mixing event. The assumption of the saturation of the gas phase along the bed was not completely correct. Finally, this model can be used in the indirect estimation of bed moisture, but the model must be validated with other experiments and by monitoring the respirometric variables that is also predicted by the model. Some considerations used by the model must be revised, as the saturation of the bed, but the method of indirect measurement of the bed moisture must be considered as an alternative to estimate the key variables of the process that don't have sensors for adequate on-line measurement.

1. INTRODUÇÃO

O processo de fermentação em estado sólido (FES) envolve o crescimento de microrganismos sobre materiais sólidos na ausência ou quase ausência de água livre entre as partículas sendo que o espaço interpartículas é preenchido por uma fase gasosa contínua. Esta é a principal característica que torna esse sistema totalmente diferente da fermentação submersa (FS) que possui somente uma fase líquida contínua. Em certos casos, a FES tem o potencial de produzir um número de produtos biotecnológicos com maior eficiência que a tradicional FS. Por exemplo, na produção de esporos fúngicos utilizados como biopesticidas, não somente o rendimento dos esporos é mais elevado em FES do que em FS (BOYETTE et al., 1991) como também os esporos produzidos são mais robustos e mais virulentos que os esporos produzidos em FS (MORIN, 1992). Outro exemplo é a produção de enzimas fúngicas com maiores rendimentos em sistemas de FES (PANDEY et al. 2000). Entretanto, a respeito deste potencial, relativamente poucos processos estudados em laboratório têm sido comercializados com sucesso.

O maior problema para realizar a transferência desta tecnologia para biorreatores de larga escala está na dificuldade de controlar e manter as condições ótimas necessárias para um bom crescimento do microrganismo e formação de produto no leito do substrato em um biorreator industrial. A temperatura do leito pode ser considerada neste sistema a variável mais crítica de se controlar, pois é difícil evitar o seu aumento significativo que ocorre devido às limitações na eficiência da remoção do calor metabólico gerado pelo microrganismo durante a fase de crescimento. Com isso, a temperatura do leito pode alcançar valores que afetam o microrganismo. Na maior parte dos casos o projeto e a operação dos biorreatores de FES são feitos através do método de “tentativa e erro”, resultando em processos de baixa eficiência e gastos desnecessários.

Desta forma, existe uma necessidade urgente de desenvolver estratégias racionais para otimizar o projeto e a operação de biorreatores de FES, visando aumentar a eficiência dos processos e, assim, torná-los economicamente viáveis.

Estas estratégias devem ser baseadas em modelos matemáticos que descrevam as interações entre os fenômenos físicos e biológicos no biorreator. Tais modelos já são aplicados a FS há muitos anos (KOSSEN e OOSTERHUIS, 1981). Em contraste, a modelagem de biorreatores

de FES começou somente em 1990 e ainda muitos aprimoramentos são necessários antes que os modelos sejam ferramentas verdadeiramente úteis no projeto de biorreatores de FES (MITCHELL et al., 2000a, 2002).

Os modelos matemáticos para biorreatores precisam consistir em submodelos que descrevam os balanços de massa, energia e um submodelo que descreva a cinética de crescimento do microrganismo. Os submodelos de balanço de massa e energia descrevem o transporte de massa e energia no leito, no *headspace* e nas paredes do biorreator. O submodelo de cinética de crescimento deve descrever como esta cinética é afetada por diversas variáveis como temperatura, pH e atividade de água.

Então, a temperatura deve ser considerada uma variável-chave na otimização do desempenho de biorreatores de FES, pois pode ser influenciada por sistemas de controle (IKASARI et al., 1999). Estudos apontam que a melhor maneira de manter a temperatura em valores ideais é através da agitação do leito ou de uma corrente de ar resfriado atravessando o leito (ASHLEY et al., 1999). Por outro lado, quando se utiliza uma corrente de ar resfriado fluindo através de um leito estático, para controle da temperatura, isso pode secar o leito e diminuir a atividade de água até valores que limitam o crescimento do microrganismo. Além de não ser tão eficiente, devido à passagem unidirecional do fluxo provocada pela dinâmica da convecção, acaba formando gradientes de temperatura ao longo do leito (NARAHARA et al., 1984).

A agitação, além de colaborar no controle da temperatura, pode também ajudar na homogeneização do leito, mas pode inviabilizar fermentações que utilizem fungos filamentosos por infligir tensões de cisalhamento que acabam danificando as hifas.

Com isso, pode-se utilizar um método misto de controle de temperatura, empregando uma corrente de ar resfriado durante o processo, e eventos de agitação quando o teor de umidade em determinados pontos atingir valores indesejados. Este método misto aproveita a eficiência dos dois métodos e reduz os impactos da agitação no crescimento do microrganismo, pois esta ocorre menos vezes durante o processo em relação ao método utilizando somente agitação. Entretanto, para implementar esta estratégia, é necessário monitorar o teor de umidade do leito ao longo do processo para detectarmos alterações nesta variável que possam indicar valores de umidade prejudiciais à fermentação. Com este monitoramento podemos realizar

alguma ação preventiva antes que a atividade de água alcance valores limitantes para o crescimento do microrganismo.

Atualmente este monitoramento não é possível em tempo real em processos de FES, pois, para tal, seria necessária a construção de perfis temporais e espaciais da umidade do leito a partir de amostras retiradas do leito. Neste caso, seriam necessárias várias horas para a determinação da umidade do leito o qual não permite ações de controle em tempo adequado. Outra possibilidade seria monitorar a temperatura e a umidade relativa do ar, mas os sensores existentes no mercado não têm sensibilidade para monitorarem adequadamente umidades de ar próximas à saturação durante longos períodos. Para contornar este problema, pode-se monitorar *on-line* outras variáveis como a temperatura do ar de entrada e a temperatura em diferentes alturas do leito e, a partir destes dados, utilizar um modelo matemático para estimar a atividade de água em função do tempo e da altura do leito.

1.1. Objetivo e Estratégia

Esta dissertação almeja contribuir com o desenvolvimento da tecnologia de biorreatores utilizados para fermentação em estado sólido (FES) que apresenta dificuldades no monitoramento e controle de parâmetros do processo, tais como a temperatura e a atividade de água, próximo aos valores ótimos para o crescimento do microrganismo.

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um modelo matemático que permita estimar a umidade *on-line* da fase sólida em diferentes alturas do leito. Para isso, foram utilizados os valores obtidos da temperatura na entrada do ar e do leito durante o cultivo do fungo *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 em um biorreator de FES em escala piloto.

Os experimentos, para aquisição de dados para validação do modelo matemático, foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Otimização de Processos Bioquímicos (ProBio), do programa de Pós-Graduação em Engenharia (PIPE) na Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde foi construído um biorreator de escala piloto com aeração forçada e agitação intermitente, tendo capacidade para um leito de aproximadamente 120 kg a 160 kg de substrato úmido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão será abordada a importância da FES como uma técnica de produção biotecnológica. Posteriormente, serão mostrados os tipos de biorreatores utilizados nos processos de FES, destacando suas características, limitações e modelagem matemática. A comparação destes biorreatores mostrará que o biorreator que foi construído pelo grupo possui um bom potencial para promover condições favoráveis ao crescimento do microrganismo. Finalmente, serão demonstradas as estratégias de monitoramento e controle das variáveis do processo como a temperatura e umidade do leito e a necessidade de se utilizar um método *on-line* para estimar a umidade do leito indiretamente através do monitoramento das temperaturas no leito.

2.1. Características Gerais da Fermentação em Estado Sólido

Atualmente, a maioria dos processos de fermentação podem ser divididos entre fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). A diferença entre estes dois bioprocessos consiste na quantidade de líquido livre presente no sistema. A FES envolve o crescimento de microrganismos em partículas de substrato sólido onde grande parte da água está absorvida dentro das partículas com quantidade de água livre entre as partículas muito baixa, enquanto em FS o microrganismo cresce dentro de uma fase líquida contínua. Devido à baixa quantidade de água disponível na FES, pode ocorrer a formação de produtos específicos que não seriam produzidas na FS. Além disto, para certos produtos que podem ser obtidos por ambas técnicas de fermentação, a FES apresenta maior produtividade volumétrica e maior rendimento em relação à FS (MOO-YOUNG; MOREIRA; TENGGERDY, 1983).

Na indústria, a técnica de FES é aplicada em alguns segmentos como:

- Indústria alimentícia: produção de enzimas, ácidos orgânicos, aromas e outras substâncias de interesse;
- Indústria Farmacêutica: um número pequeno de antibióticos é produzido por FES;
- Agroindústria: produção de biopesticidas. A FES é preferida para a produção de biopesticidas, pois o rendimento dos esporos fúngicos é maior quando comparado com a FS;

- Desintoxicação biológica: Alguns resíduos agro-industriais são tóxicos, como a casca da mandioca, e a FES tem sido utilizada recentemente para desintoxicar estes resíduos.

Nesses processos de FES utilizados na indústria, podem ser utilizados substratos de origem natural, como resíduos agro-industriais, e sintéticos, entretanto, geralmente são utilizados cereais, inteiros ou quebrados, de acordo com as habilidades degradativas do microrganismo utilizado. De qualquer forma, as características gerais do material sólido utilizado na FES são que: (1) este se constitui de um material poroso, (2) a matriz deve absorver água, (3) a matriz sólida deve resistir à compressão ou leves agitações, e (4) a matriz deve ser capaz de absorver ou conter fonte disponível de alimento ao microrganismo tais como carboidratos (celulose, amido, açúcar), fontes de nitrogênio (amônia, uréia, peptídeos) e sais minerais (RAIMBAULT, 1998).

O biorreator é o local onde ocorre o processo de fermentação, onde são adicionados o substrato e o inóculo para posterior retirada do produto. Através dele procura-se fornecer condições ambientais mais favoráveis para o crescimento dos microrganismos e para a formação do produto, tentando controlar principalmente a temperatura e a umidade do leito.

Visando ilustrar este processo, a FIGURA 1 mostra um biorreator do tipo tambor rotativo tipicamente utilizado e a estrutura física do leito. Estes processos comumente envolvem fungos filamentosos, que são bem adaptados em sólidos umedecidos, uma vez que isto imita seu nicho na natureza.

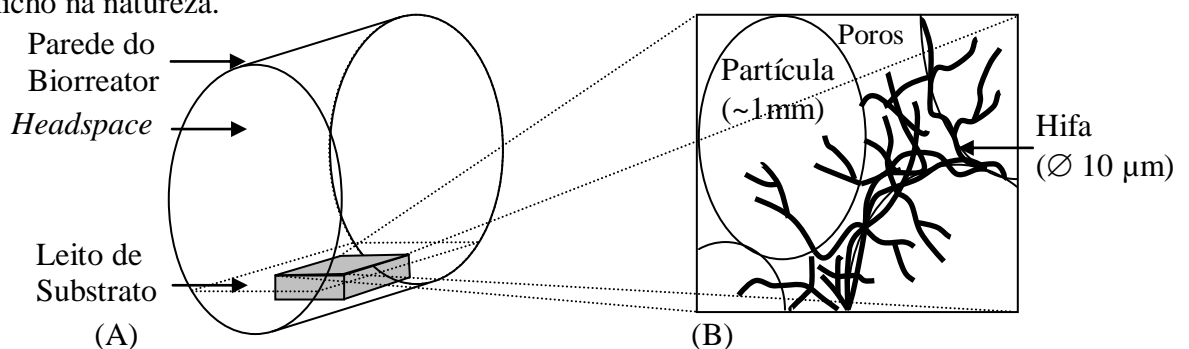


FIGURA 1. Características gerais de (A) biorreatores de FES e (B) estrutura do leito de substrato.

Entretanto, é difícil controlar as condições do leito do biorreator nos valores ótimos para o crescimento do microrganismo e a produção de metabólitos. Este problema é resultado das

limitações de transferência de massa e de calor dos leitos sólidos (MITCHELL et al., 2000a) e do *design* do biorreator utilizado.

No passado, grande parte dos biorreatores de FES foi construída na forma de “tentativa e erro” o que resultou em processos de baixa produtividade (LONSANE et al., 1992). O maior desafio na construção dos biorreatores é evitar que a temperatura alcance valores altos e também evitar que o leito seque a ponto de prejudicar o crescimento do microrganismo. Para desenvolver estratégias para a manutenção de condições adequadas ao crescimento do microrganismo nos biorreatores, é necessária a utilização dos modelos matemáticos.

A função dos modelos matemáticos é descrever os fenômenos de transferência de calor e massa que ocorrem no biorreator e com isso prever o comportamento do leito do substrato. Após a validação dos modelos a partir de dados reais obtidos no biorreator, estes modelos poderão ser utilizados como ferramentas para guiar a construção e otimização de biorreatores em escalas maiores.

2.2. Biorreatores de FES

Os biorreatores de fermentação em estado sólido podem ser classificados através das estratégias de operação em relação aos regimes de agitação e aeração (MITCHELL et al., 2006):

- a) Biorreator com agitação ocasional, sem aeração forçada. Este grupo inclui as bandejas.
- b) Biorreator com agitação contínua, sem aeração forçada. Este grupo inclui tambores rotativos e tambores agitados, nos quais o ar é introduzido somente no *headspace* do biorreator.
- c) Biorreator com aeração forçada sem agitação ou com agitação ocasional. Este grupo inclui leitos fixos agitados intermitentemente em que o leito do substrato está sobre uma base perfurada, com ar sendo forçado através do leito.
- d) Biorreator com agitação freqüente e com aeração forçada. Este grupo inclui várias geometrias. Também é possível que o leito seja agitado mecanicamente ou pela aeração como no caso dos biorreatores de leito fluidizado.

Através dessa proposta de classificação os biorreatores podem ser divididos em grupos de acordo com a maneira que a fermentação é conduzida e operada.

2.2.1. Descrições dos Biorreatores

2.2.1.1. Biorreator com Agitação Ocasional, sem Aeração Forçada

O reator em bandeja, mostrado na FIGURA 2, constitui-se de uma câmara que contém várias bandejas individuais, sendo que cada bandeja contém uma camada de substrato estático e não possui aeração forçada. O ar que circula dentro do biorreator ao redor das superfícies das bandejas remove o calor e o dióxido de carbono por convecção e transporta o oxigênio para a superfície do leito da bandeja.

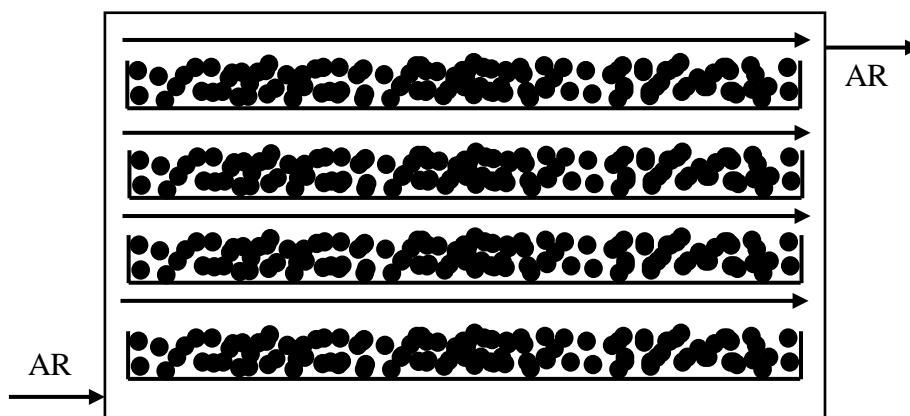


FIGURA 2. Esquema do biorreator em bandejas. O ar deve ser injetado preferencialmente no fundo do biorreator e circula ao redor das bandejas que contém o substrato.

Os leitos que comportam os substratos não devem possuir uma espessura superior a 5 cm, pois como não há passagem de ar através do leito, que permanece estático durante a fermentação, com agitação manual feita somente ocasionalmente, ocorre a presença de gradientes de temperatura e com uma espessura pequena é mais fácil prevenir temperaturas altas na bandeja.

O uso de sacos plásticos perfurados, ao invés de bandejas de madeira ou vime, é uma inovação nos biorreatores em bandeja, pois permite a troca de gases do leito do substrato e da atmosfera ambiente e pode prevenir a contaminação por bactérias e esporos de fungos (HARDIN; MITCHELL, 1998). A ampliação de escala deste biorreator pode ser feita

somente aumentando-se o número de bandejas, mas isto também aumenta o custo da mão de obra, o que pode tornar o processo inviável.

2.2.1.2. Biorreator com Agitação Contínua, sem Aeração Forçada

Os tambores rotativos mostrados na FIGURA 3 e os tambores agitados mostrados na FIGURA 4 são constituídos de um tambor com o eixo horizontal ou levemente inclinado que possui um leito de substrato cujo volume é de aproximadamente um terço do volume do tambor. A diferença entre os tambores rotativos e os agitados é que no tambor rotativo o corpo do tambor é revolvido para agitar o leito, enquanto que no tambor agitado o corpo do tambor permanece estático e o leito é misturado por um agitador instalado num eixo central que gira dentro do tambor.

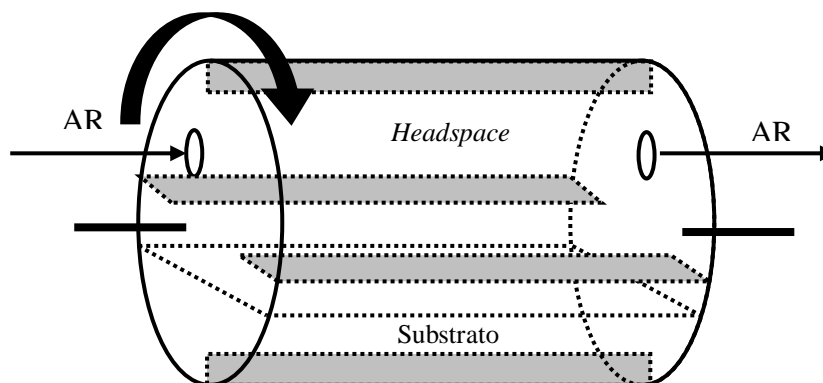


FIGURA 3. Esquema do biorreator de tambor rotativo.

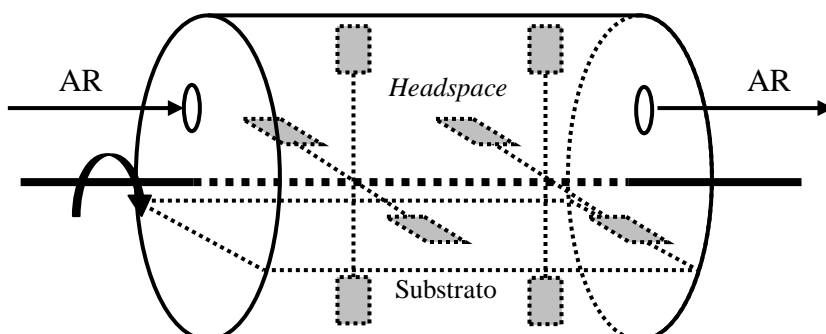


FIGURA 4. Esquema do biorreator de tambor agitado através de pás. Um motor gira a haste que contém as pás que misturam o substrato.

A aeração é feita através da introdução de ar diretamente no *headspace*. Simultaneamente ao ar injetado ocorre a agitação do leito através da rotação do tambor ao redor do seu próprio eixo ou através da agitação por pás.

O uso dos biorreatores deste grupo é restringido pela ineficiência de transferência de massa e calor entre o leito e o *headspace*. A velocidade de transferência pode ser melhorada no tambor rotativo pela introdução de chicanas no interior dos tambores (FUNG; MITCHELL, 1995). Estes reatores podem ser facilmente adaptados para operações contínuas, tendo potencial para aumentar a produtividade em grande escala (KHANAHMADI et. al, 2006).

2.2.1.3. Biorreator com Aeração Forçada sem Agitação ou com Agitação Ocasional

A característica básica deste grupo é a introdução de ar através de uma peneira que suporta o substrato, conforme é mostrado na FIGURA 5, e o leito fica estático durante toda a fermentação ou durante a maior parte da fermentação (DURAND; CHEREAU, 1988).

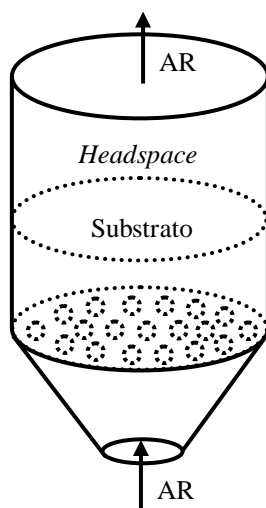


FIGURA 5. Esquema do biorreator de leito fixo. O ar é injetado no fundo do biorreator passando através do leito do substrato.

O desenho mais avançado do leito fixo contém pratos internos de transferência de calor conforme é mostrado pela FIGURA 6, como uma forma de tentar evitar os problemas com altas temperaturas comumente encontradas em biorreatores de leito fixo (HARDIN; MITCHELL, 1998, ROUSSOS et al., 1993).

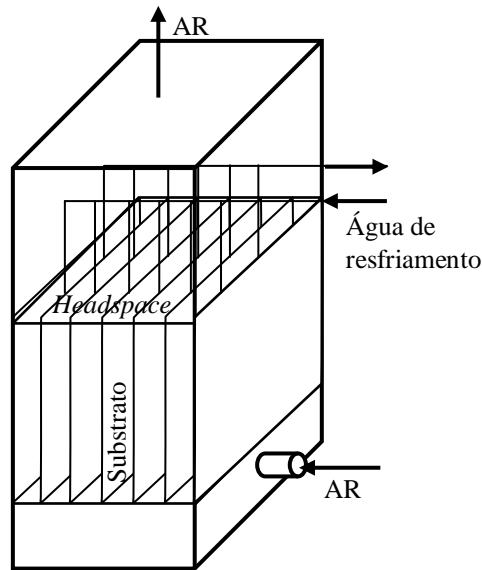


FIGURA 6 - Biorreator Zymotis. O ar é injetado na base e passa através do leito. O leito do substrato fica entre placas onde é circulada água para o resfriamento do leito.

2.2.1.4. Biorreator com Agitação Contínua e com Aeração Forçada

Os biorreatores deste grupo incluem reatores de várias geometrias e modos de operação, sendo incluídos neste grupo pelo fato do leito ser agitado continuamente e aerado forçadamente. Os reatores podem ser distinguidos com base no método de agitação, sendo:

- Leito mecanicamente agitado: neste biorreator o sólido permanece sobre uma base perfurada na qual o ar está sendo injetado, enquanto um agitador mistura o leito, conforme é mostrado na FIGURA 7.

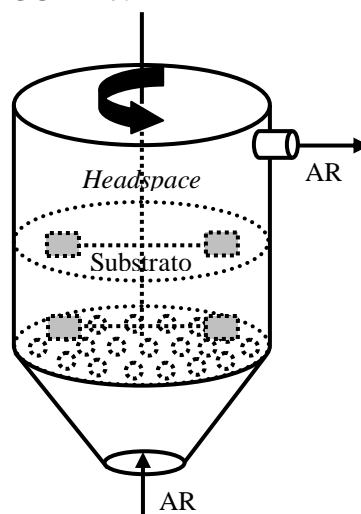


FIGURA 7. Esquema do biorreator de leito mecanicamente agitado. O centro é agitado por um misturador mecânico enquanto o ar é injetado através do leito.

- Leito fluidizado: neste biorreator o ar é injetado numa velocidade suficiente para manter em suspensão as partículas de substrato, conforme é mostrado na FIGURA 8. Devido à grande vazão do ar, a remoção de calor do leito não é problemática, mas o uso de leitos fluidizados implica em altos custos de operação.

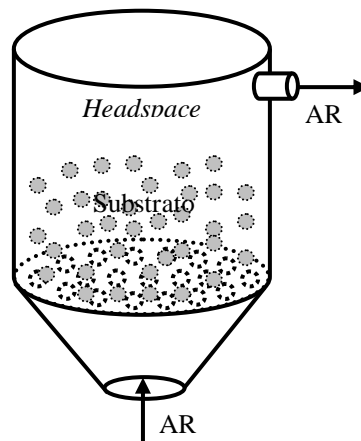


FIGURA 8. Esquema do biorreator de leito fluidizado. O ar é injetado no fundo do biorreator em velocidade suficientemente alta para manter as partículas do substrato suspensas.

2.2.2. Modelos Matemáticos para Biorreatores

2.2.2.1. Biorreatores com Agitação Ocasional, sem Aeração Forçada.

Os modelos matemáticos para a construção de biorreatores em bandeja incluem descrições da transferência de oxigênio e calor dentro do leito. Estes modelos confirmam que o leito deve ser limitado a uma espessura de no máximo 5 cm para que haja uma adequada remoção de calor para que não interfira no crescimento do microrganismo. Neste caso, a transferência de O_2 não é um fator limitante para o crescimento, visto que a limitação da difusividade do O_2 depende da porosidade do leito e a limitação da temperatura depende da condutividade térmica. (RAJAGOPALAN; MODAK, 1995)

2.2.2.2. Biorreatores com Agitação Contínua Lenta, sem Aeração Forçada.

Os modelos matemáticos para tambores rotativos foram construídos admitindo-se que dentro do leito o ar e o sólido estão em equilíbrio. Um modelo desenvolvido para um tambor rotatório considera que o ar injetado no *headspace* do biorreator possui um padrão de fluxo uniforme (MITCHELL et al., 2002a). Um outro modelo desenvolvido admite que o leito e ar

no biorreator são fases individualmente bem misturadas (STUART e MITCHELL, 2003). Porém, estudos de padrão de fluxo mostraram que a fase gasosa não é bem misturada e não tem fluxo uniforme (HARDIN; HOWES; MITCHELL, 2001). Para o modelo descrever corretamente a transferência de massa e calor entre o leito e o *headspace*, é necessário incorporar uma descrição matemática do padrão de fluxo na fase gasosa (HARDIN; HOWES; MITCHELL, 2002).

Para as partículas sólidas no leito, o padrão de fluxo pode ser descrito por um método computacional chamado de “modelagem de partícula discreta” (SCHUTYSER et al., 2001 e 2002). Este método rastreia a posição de cada partícula de substrato sólido e pode ser usado para prever padrões de fluxo das partículas no leito devido à rotação de um tambor ou à ação de um agitador interno. Estes modelos podem ser estendidos para descrever a transferência de massa e calor (SCHUTYSER et al., 2003), mas esta abordagem torna-se difícil uma vez que o programa demora semanas para ser executado, sendo que durante este tempo seria possível realizar vários cultivos experimentais.

2.2.2.3. Biorreatores com Aeração Forçada, sem Agitação ou com Agitação Ocasional

O primeiro modelo matemático para biorreatores de tipo leito fixo desenvolvido baseava-se na remoção de calor apenas por condução radial (SAUCEDO-CASTANEDA et al. 1990). Este modelo foi posteriormente estendido para também incluir a remoção de calor por condução axial, transferência por convecção e evaporação (SANGSURASAK; MITCHELL, 1995). Este modelo foi validado experimentalmente (SANGSURASAK; MITCHELL, 1998) e foi feita uma previsão para avaliar o desempenho do biorreator em grande escala, baseada nas temperaturas alcançadas pelo leito (MITCHELL et al., 1999). Este modelo foi estendido para incluir o balanço de água (WEBER et al., 1999) e posteriormente foi validado experimentalmente em diferentes combinações de microrganismos e substratos (WEBER et al., 2002).

Outro modelo matemático foi feito para o reator chamado Zymotis, que é um tipo de biorreator de leito fixo com placas internas para remoção de calor (MITCHELL; VON MEIEN, 2000). As previsões do modelo foram analisadas para determinar o espaçamento ótimo entre as placas internas. Através das previsões foi verificado que um espaçamento de 5

cm é adequado para promover uma boa remoção de calor pelas placas (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002).

Estes modelos para os biorreatores deste grupo foram feitos considerando a umidade relativa em 100%, em que o ar permanece em equilíbrio com o sólido, mas quando realizado experimentalmente verificou-se que esta situação não ocorre, sendo que a umidade relativa do ar de saída é de aproximadamente 90% durante a fase de maior crescimento do microrganismo (WEBER et al., 2002). Então, outro modelo foi desenvolvido o qual não considera o equilíbrio das fases gasosa e sólida, mas que incorpora equações para descrever a transferência de calor e massa entre a fase sólida e a fase gasosa interpartículas (VON MEIEN e MITCHELL, 2002). Também neste modelo foi permitido que houvesse eventos de agitação intermitente.

Com relação aos modelos para reatores do tipo leito fixo, algumas melhorias ainda precisam ser feitas. Pois, nenhum dos modelos leva em conta o efeito no fluxo do ar, tal como a perda de carga, que provem do enchimento dos espaços interpartícula com a biomassa microbiana que se desenvolve na superfície das partículas ao longo do cultivo.

2.2.2.4. Biorreatores com Agitação Frequente e com Aeração Forçada

Existem poucos modelos que tratam dos balanços de energia para os biorreatores deste grupo. Um modelo de tambor rotativo com agitação frequente e aeração forçada foi proposto tratando o balanço de energia no processo para um sistema bem misturado (SARGANTANIS et al., 1993). Um outro modelo para um leito agitado intermitentemente foi proposto posteriormente, porém com agitações mais frequentes (ASHLEY, MITCHELL e HOWES, 1999). Esse modelo foi utilizado para investigar a frequência de eventos de agitação que é necessária para que não haja problemas de altas temperaturas alcançadas no biorreator. Com isso foi verificado que misturas de 10 a 60 vezes por hora proporcionavam temperaturas máximas mais baixas no leito, mas a frequência de agitação depende da velocidade de crescimento do microrganismo.

Todos os modelos deste grupo consideram equilíbrio entre a fase gasosa e sólida, mas isto pode não ocorrer na prática, principalmente porque o ar injetado nas perfurações das placas

pode não permanecer saturado ao passar pelo leito até sua exaustão. Assim, é necessário desenvolver um modelo incluindo a transferência de massa e calor entre as fases, e isto pode ser obtido utilizando-se como base os modelos desenvolvidos para leitos fixos com agitação intermitente (VON MEIEN e MITCHELL, 2002).

2.3. Cinética de Crescimento do Microrganismo

O crescimento do microrganismo afeta o desempenho do biorreator através da produção de calor e água metabólica, portanto uma descrição adequada do crescimento é importante nos modelos utilizados para os biorreatores. A maioria dos modelos utiliza equações empíricas para descrever o crescimento do microrganismo devido à sua simplicidade. A equação logística é a mais utilizada nos modelos para os biorreatores, por se ajustar de maneira aceitável na maioria dos dados experimentais (VICCINI; MITCHELL; KRIEGER, 2001).

Devido aos problemas de retirada de calor do biorreator, as equações empíricas devem descrever o efeito das variações temporais da temperatura no crescimento do microrganismo. Para isso, os modelos matemáticos descrevem o efeito da temperatura na taxa de crescimento específico. Neste caso, a determinação da equação tem sido feita cultivando-se culturas do microrganismo em diferentes temperaturas, com cada cultura sendo exposta a uma temperatura constante durante todo o crescimento (SMITS, et al. 1998). Entretanto, essas não são as condições experimentadas pelo microrganismo no biorreator onde ocorrem grandes variações na temperatura durante todo o processo. Portanto, foi desenvolvido um modelo que descreve o efeito da temperatura no crescimento através da desnaturação de um componente essencial contido dentro da célula de um fungo. Esse modelo obteve um bom ajuste aos dados experimentais quando o fungo foi submetido a variações de temperatura durante o cultivo. Com isso, como é difícil monitorar o crescimento do microrganismo sobre substratos sólidos, a utilização desse modelo pode servir como uma ferramenta para estimar o crescimento do microrganismo e na modelagem de biorreatores de FES (DALSENTER et al., 2005).

2.4. Monitoramento e Controle da Fermentação em Estado Sólido

A fim de operar o processo com reprodutibilidade e com segurança, algumas variáveis relevantes do processo devem ser medidas (variáveis medidas) e algumas outras devem ser

modificadas (variáveis manipuladas), continua ou ao menos periodicamente. Isto é necessário, pois o sistema de fermentação no estado sólido pode sofrer influência de diversos tipos de perturbações que afetarão a operação e o desempenho do processo caso não sejam detectadas e corrigidas.

Para isso é necessário definir as variáveis a serem monitoradas durante o processo para então selecionar os instrumentos para fazer estas medidas. Em biorreatores de FES é necessário basicamente assegurar o crescimento do microrganismo e a produção das quantidades previstas do metabólito desejado, estabelecendo as condições ótimas para isso.

2.4.1. Variáveis do Processo

Para alcançar os objetivos de acordo com as necessidades do processo é necessário que algumas variáveis sejam monitoradas e controladas *on-line*.

Dentre essas variáveis, o monitoramento e controle da temperatura do leito é um ponto chave para a otimização do processo. A heterogeneidade do leito na FES promove o aparecimento de gradientes de temperatura e conseqüentemente é necessária a utilização de sensores de temperatura em diferentes posições dentro do leito para que se obtenha uma estimativa média. Esses gradientes de temperatura dentro do leito podem interferir no desempenho do processo, pois afeta o crescimento do microrganismo devido o aparecimento de regiões quentes.

A umidade do leito é outra variável-chave que deve ser medida e controlada periodicamente, especialmente durante a fase exponencial do crescimento, para evitar a secagem do leito. Como a umidade está relacionada com a atividade de água do meio, a diminuição desta atividade de água devido à secagem pode prejudicar o crescimento dependendo do microrganismo utilizado.

Uma forma bastante empregada para a manutenção dessas variáveis, tanto da temperatura como da umidade do leito em biorreatores de FES, é através da manipulação das condições do ar da entrada. Portanto, essas variáveis do ar de entrada, como a temperatura, o fluxo e a umidade, devem ser também monitoradas e controladas durante o processo.

Além dessas variáveis, durante o processo fermentativo, o crescimento de fungos filamentosos reduz a porosidade do leito, conseqüentemente diminuindo a taxa de transferência de O_2 entre a fase gasosa e o leito e limitando também a remoção do calor gerado pelo metabolismo do microrganismo. Desta forma, monitorar a porosidade do leito é necessário para processos que envolvam biorreatores operados estaticamente ou com agitações periódicas do leito.

Para avaliar o crescimento do microrganismo, pode-se determinar a concentração de biomassa no processo, o qual pode alterar as propriedades do leito ao longo do tempo. Atualmente nenhum método confiável está disponível para o monitoramento contínuo da biomassa em biorreatores industriais de FES, ao contrário dos processos que envolvem a fermentação líquida. As estimativas são complicadas pelo fato que a heterogeneidade dentro do leito faz com que o microrganismo cresça de forma desigual em certos pontos.

Como uma alternativa, para estimar esse crescimento do microrganismo, é possível utilizar as variáveis respirométricas que envolve a concentração de CO_2 e O_2 que podem ser monitoradas. O acompanhamento da exaustão desses gases pode fornecer informações sobre o processo e os gases provenientes da respiração também podem relatar sobre o estado fisiológico do microrganismo. Essas informações, como o consumo de O_2 e o coeficiente respirométrico podem ser calculados a partir das concentrações dos gases e a taxa de fluxo total (SATO et al. 1983; SATO E YOSHIKAWA 1988; OOIKAAS et al. 1998).

Para que ocorra um melhor crescimento, cada microrganismo possui um pH ótimo definido. Entretanto, é difícil medir o pH de um leito de FES. A heterogeneidade do meio dificulta um monitoramento com precisão. Desta forma o pH não pode ser medido *on-line* e nem ser controlado, sendo uma prática adotada a utilização de soluções tampão no preparo do substrato, evitando deste modo que o pH mude muito durante a fermentação.

Outras variáveis do processo, necessárias para analisar o rendimento são a concentração de substrato inicial e a concentração de produto formado. Desta forma, o monitoramento dessas concentrações é crítico para a garantia da produtividade e da qualidade. Em determinados casos o substrato utilizado ou produto resultante variam, com isso o monitoramento *off-line* dessas concentrações se faz necessário para estabelecer o melhor tempo de fermentação.

2.4.2. Monitoramento *On-Line* através de Instrumentos

Para permitir o monitoramento adequado das variáveis do processo são utilizados instrumentos específicos. Então, para obter o melhor monitoramento das condições do leito, é necessário a avaliação das vantagens e limitações de cada instrumento, precisão e custo relativo.

Os sensores utilizados dentro do leito sólido de um biorreator, que requer agitação, devem ser escolhidos e instalados adequadamente para prevenir danos ao sensor devido ao movimento dos sólidos durante os períodos de agitação.

Para o monitoramento da temperatura é possível a utilização de diversos sensores que permitirão monitorar a distribuição da temperatura no leito do substrato e para medir a temperatura do ar de entrada e saída do processo. Dentre esses sensores de temperatura temos os termopares, sendo os mais utilizados no meio industrial, pois possui um baixo custo, ampla faixa de amplitude de medição e respostas rápidas. Entretanto, os termopares apresentam baixa precisão. Para o processo de FES, os detectores de temperatura de resistência são melhores, pois estes sensores são estáveis, precisos, com resposta rápida e não necessitam de uma calibração periódica, mas são mais caros e mais frágeis que os termopares.

Os sensores e métodos utilizados para monitorar continuamente o conteúdo de água de sólidos não tiveram um bom desempenho na área de FES. Os métodos propostos até então necessitam de 2 a 15 horas para se obter um resultado, sendo que isto é inviável para um monitoramento *on-line* (CREUS, 1998a). Os sensores baseados em capacitância são muito sensíveis à área de contato entre o eletrodo e a amostra, sendo que tais dispositivos podem ser úteis na medição do conteúdo de água da fase sólida em biorreatores de leito estático, mas estão limitados a monitorar com confiabilidade um conteúdo máximo de água do leito de 50% (CREUS, 1998a) que é muito baixo para a maioria de processos de FES. Outros dispositivos de medição comercialmente disponíveis para o monitoramento da umidade, tais como o infravermelho, são muito caros e também pouco práticos em biorreatores de FES por serem frágeis (BRODGESELL E LIPTÁK, 1995; CREUS, 1998a).

Outra variável onde existem diversos métodos de monitoramento é o fluxo volumétrico ou mássico de ar no processo. Existem métodos baseados na queda de pressão (tubo de Pitot, Venturi e medidor de fluxo por orifício), na área variável (rotâmetros) e na velocidade (anemômetros, turbinas), usados para medir a taxa de fluxo volumétrica. Estas técnicas podem ser também adaptadas para medir as taxas de fluxo mássico, onde a compensação da pressão e da temperatura em cada caso é requerida. Embora haja muitas opções, é difícil selecionar um medidor de fluxo adequado, pois nem todos são aplicáveis em um dado sistema devido ao espaço, ao custo e a precisão (LOMAS E LIPTÁK, 1995). Além disso, em alguns casos um dispositivo de retificação do fluxo teria que ser instalado antes do sensor (SIEV et al., 1995). É aconselhável definir o tipo dos medidores de fluxo que cobrem a escala de medida de interesse e identificar então aqueles que têm a melhor aplicação, considerando o erro permissível máximo, a pressão e a temperatura de operação que o sensor estará exposto a e o tipo de fluxo (laminar, turbulento ou transiente). Na avaliação de custos, além do preço de compra, devem-se considerar os custos de manutenção, às peças de reposição e à operação do sensor, desde que um instrumento apropriado pode ser barato, mas a longo prazo os outros custos podem fazê-lo pouco prático.

O efeito da porosidade do leito pode ser monitorada *on-line* através da queda da pressão do leito sólido (AURIA et al. 1993; VILLEGAS et al. 1993; BELLON-MAUREL et al. 2003). Por exemplo, em biorreatores estáticos a medição da queda da pressão pode ser usada para manter a taxa do fluxo do ar de entrada sobre controle ou em biorreatores agitados periodicamente, para estabelecer intervalos de agitação.

Outra análise importante é a dos gases de entrada e saída do biorreator, que pode ser conduzida através da utilização de um cromatógrafo a gás (CG) (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al. 1992; SAUCEDO-CASTAÑEDA et al. 1994) ou por analisadores específicos de gases (SMITS et al. 1996; FERNÁNDEZ et al. 1997). Em ambos os casos, para se obter resultados confiáveis, deve-se manter a taxa de fluxo regulada e secar a amostra de ar antes da entrada no analisador. Algumas vezes o CG é preferido em relação a analisadores específicos, pois o mesmo pode analisar muitos compostos além do CO₂ e O₂. Por outro lado, analisadores de gases são mais precisos e possuem tempos rápidos de resposta (alguns segundos). Estes equipamentos utilizam propriedades físicas ou químicas, como o para-magnetismo ou absorção atômica, o qual caracteriza o gás a ser analisado. Analisadores paramagnéticos,

disponíveis para a medição de O_2 , são provavelmente os mais eficazes (KAMINSKI et al. 1995; CREUS 1998b). Embora caros, são muito precisos, não requerem a calibração periódica e apresentam baixa interferência com outros gases (se o vapor de água for removido). Estes instrumentos exploram a propriedade que alguns gases têm de se magnetizar quando são expostos a um campo magnético. Os analisadores eletroquímicos são usados também para medir as concentrações de O_2 , desde que possuem um custo baixo e fornecem uma precisão boa; entretanto, a célula de medição deve ser substituída periodicamente (uma ou duas vezes por ano). O CO_2 pode ser também medido com confiabilidade através de instrumentos infravermelhos, que são precisos e têm uma vida longa, embora sejam caros e necessitam de uma calibração ocasional (CREUS 1998b). Estes analisadores usam a capacidade que o CO_2 tem de absorver a radiação infravermelha dentro de um espectro característico.

Entre todos os sensores, o mais preciso e versátil é o sensor de pH. Os métodos de medição envolvem um eletrodo de vidro e um transistor íon sensível. Os eletrodos de vidro consistem de um tubo de vidro dividido por uma membrana, geralmente feita de vidro, que é especialmente sensível aos íons de hidrogênio. A sua fragilidade é a sua principal limitação, pois a membrana pode ser danificada facilmente. Por outro lado, o eletrodo de transistor é mais robusto, muito preciso e com resposta rápida (CREUS, 1998c). A medição direta do pH em substratos sólidos porosos pode não ser preciso devido ao pequeno contato entre o sólido e a área sensível do eletrodo. Embora existam eletrodos flexíveis que se adaptam melhor as amostras sólidas, sua aplicabilidade é limitada para leitos estáticos, pois a agitação pode danificar o eletrodo. Neste caso o monitoramento não pode ser extrapolado para o resto do leito devido a sua heterogeneidade (MITCHELL, et al. 1992).

2.4.3. Filtro de Dados

O monitoramento das variáveis do processo geralmente sofre interferências de algum meio externo que acaba gerando erros nas medições. Esses erros (sistemáticos, grossos e ruídos) interferem com a operação do sistema e com a análise de dados que são utilizados como parâmetros de entrada em modelos matemáticos ou para monitoramento e controle do processo.

Os erros sistemáticos ocorrem devido a incorreta calibração do instrumento, onde os valores médios da medição não correspondem ao valor verdadeiro da variável medida. Erros grosseiros, onde se obtêm valores falsos da variável medida, ocorrem devido o mau funcionamento de sistema de monitoramento. Os ruídos podem ser classificados como ruídos de alta frequência, associados com a limitação do instrumento utilizado que não pode produzir o mesmo valor exato após uma série de medições independentes, mesmo quando a variável medida é mantida constante; ruídos de média frequência, devido à heterogeneidade do processo (turbulência e pouca agitação); e os ruídos de baixa frequência, causados pelas perturbações do processo (condições ambientais, calor metabólico e secagem do leito etc.). Os efeitos dos ruídos de baixa frequência podem ser minimizados pelos processos de controle automáticos e os ruídos de alta e média frequência podem ser reduzidos através do processamento de sinal, ou seja, por filtro de dados.

Num biorreator de FES de larga escala o leito sólido é heterogêneo e suas características variam ao longo do tempo (conteúdo de água, conteúdo de biomassa, porosidade etc), sendo difícil extrapolar uma média das condições diretamente das medições. Estes efeitos significam que leituras *on-line*, como as temperaturas, a taxa de fluxo de ar ou a umidade relativa, apresentam ruídos significantes e durante o período de agitação muitos erros grossos ocorrem devido a liberação de gases que estavam oclusos no leito ou de interferências elétricas do funcionamento de motores. Portanto, o processamento dos dados é de extrema importância para operar um biorreator de FES adequadamente (PEÑA Y LILLO et. al, 2000).

Isto é especialmente importante se técnicas avançadas de controle são implementadas, desde que esses algoritmos de controle não trabalhem sem modelos de processo adequados, os quais são obtidos através de dados de processo de boa qualidade. Contudo, os sinais produzidos pelos instrumentos são contínuos (analógico), normalmente os cálculos de controle são processados por microprocessadores digitais que podem ser somente operados com sinais digitais (discretizados). Assim, o sinal analógico fornecido pelo instrumento deve ser convertido para um sinal discretizado, ou seja, um sinal que possui seus valores fornecidos em intervalos de tempos regulares. O intervalo de tempo entre dois valores é conhecido como amostragem no tempo, se a amostragem no tempo é muito pequena, o sistema de controle pelo computador pode ser sobrecarregado. Entretanto, a taxa de amostragem pode ser limitada pela velocidade de processamento do dispositivo de controle e pelo número de *loops* de

controle. Por outro lado, se a amostragem no tempo é muito longa, o sinal discretizado convertido não irá reproduzir a dinâmica do processo real fornecido pelo sinal analógico original. A TABELA 1 apresenta valores comuns de amostragens no tempo utilizadas na prática.

TABELA 1. Valores de amostragem de variáveis no tempo.

Variável	Tempo de amostragem (s)
Fluxo	1
Pressão	5
Nível	10
Temperatura	20

A amostragem não elimina o ruído do sinal analógico original; então o sinal digital deve ser filtrado. Filtros digitais são procedimentos matemáticos que processam os sinais digitais *on-line* para reduzir seu ruído e representar melhor a verdadeira dinâmica da variável medida.

2.4.4. Método de Inferência (*Soft-Sense*)

Nos casos em que nenhum outro instrumento está disponível para medir *on-line* a variável desejada dentro de um custo aceitável e dentro de um tempo razoável, temos que planejar uma alternativa para medir as variáveis relevantes para o processo. Por exemplo, não é possível medir *on-line* a concentração do produto formado de uma maneira rápida, de modo a incluir em um sistema eficiente de controle, pois o procedimento de medição pode durar horas, devido esses compostos serem absorvidos pelo leite e devem ser extraídos antes da determinação analítica. Desta forma, a utilização de métodos *soft-sense* podem ser úteis nestes casos (MONTAGUE 1997). Neste método, um modelo do processo e as medidas das variáveis que são relacionados de algum modo com a variável não medida são usados para fornecer uma estimativa *on-line*.

Em FES este método é aplicado principalmente em biorreatores de escala de laboratório para a estimativa da biomassa e do conteúdo de água do leite. De qualquer forma, as variáveis medidas utilizadas no método de *soft-sense* devem ser processadas por um filtro devido a ruídos que podem interferir na estimativa. Além disso, é necessário um algoritmo do processo

por que: as medidas são contaminadas por erros e não descrevem completamente o estado do processo; os modelos do processo fornecem somente uma aproximação ao comportamento do processo real e o processo está sujeito aos distúrbios externos, que não podem ser modelados ou controlados. Alguns desses modelos são baseados em um modelo dinâmico utilizado para estimar a matéria seca e o conteúdo de biomassa em biorreatores de tambor agitado com o monitoramento somente do CO₂. Esses modelos incluem os balanços de massa e energia que consideram a formação de biomassa, água e matéria seca (RYOO, 1990)

Porém, poucos modelos para monitoramento indireto *on-line* são aplicados em biorreatores de escala piloto em FES. Por exemplo, em biorreatores de FES de escala piloto uma média do conteúdo de água do leito pode ser estimada utilizando-se o monitoramento das variáveis como a taxa de evolução do CO₂ e as condições do ar do processo como a temperatura, o fluxo e a umidade relativa. Neste caso o balanço de energia pode ser utilizado também para estimar a temperatura do leito, aproveitando o fato que essa variável pode ser facilmente medida *on-line* e pode ser utilizada para conferir a consistência do modelo de medição indireta. Contudo, os erros sistemáticos de medida das variáveis de entrada podem ser amplificados ao longo do tempo em alguns modelos integrados. Esta característica pode ter um efeito crítico, particularmente para a determinação indireta da temperatura do leito através de um modelo, pois sua dinâmica rápida torna sua calibração mais difícil (PEÑA Y LILLO et. al, 2001).

Também existem modelos de *soft-sense* que utilizam balanços de massa mais complexos para monitorar indiretamente o conteúdo de água do leito. Nestes processos são considerados para o balanço de massa a água livre para o microrganismo, além da água para o resfriamento por evaporação. Além disso, são considerados a água incorporada na biomassa, a produção metabólica de água e a água para a hidrólise do substrato (NAGEL et. al, 2001).

Entre os modelos mais simples, como o proposto nesse trabalho, temos aqueles que utilizam somente o monitoramento da temperatura de entrada e saída do ar, como uma forma de evitar custos de instrumentação, para estimar a umidade do leito através da diferença entre as temperaturas, mas isso somente foi realizado para leitos com altura de no máximo de 6 cm de altura (KHANAHMADI et. al, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meio de Cultivo

Foram utilizados os seguintes meios de cultivo:

Meio de Cultivo A: para o preparo de inóculo e produção de esporos em erlenmeyers e em tubos de ensaio foi utilizado um meio com 3,9 % Ágar Batata Dextrosado (Biobrás) e 2 % de Ágar bacteriológico (Biobrás) dissolvidos em água destilada sob agitação e aquecimento. A esterilização do meio foi realizada em autoclave a 121 °C durante 20 min.

3.2. Microrganismo

Neste trabalho utilizou-se o fungo *Rhizopus oryzae* linhagem ATCC 34612.

3.2.1. Manutenção do Microrganismo

Para manutenção do microrganismo foram feitos repiques trimestrais, em câmara de fluxo laminar, em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultivo A inclinado estéril, sendo este meio mais apropriado para produção de esporos. Esses tubos foram então inoculados com aproximadamente 1 mL de uma suspensão de esporos com aproximadamente 1.10^6 esporos.mL⁻¹ obtida a partir de um tubo que estava armazenado na geladeira. Para obter esta suspensão de esporos adicionou-se 10 mL de água estéril ao tubo que estava na geladeira e agitou-se com uma alça de platina esterilizada em bico de Bünsen. Os tubos inoculados foram então incubados em câmara de cultivo a 34 °C por um período de 10 dias. Após isso os tubos foram armazenados em geladeira a 4° C para manutenção da cepa do fungo *R. oryzae* (FIGURA 9).

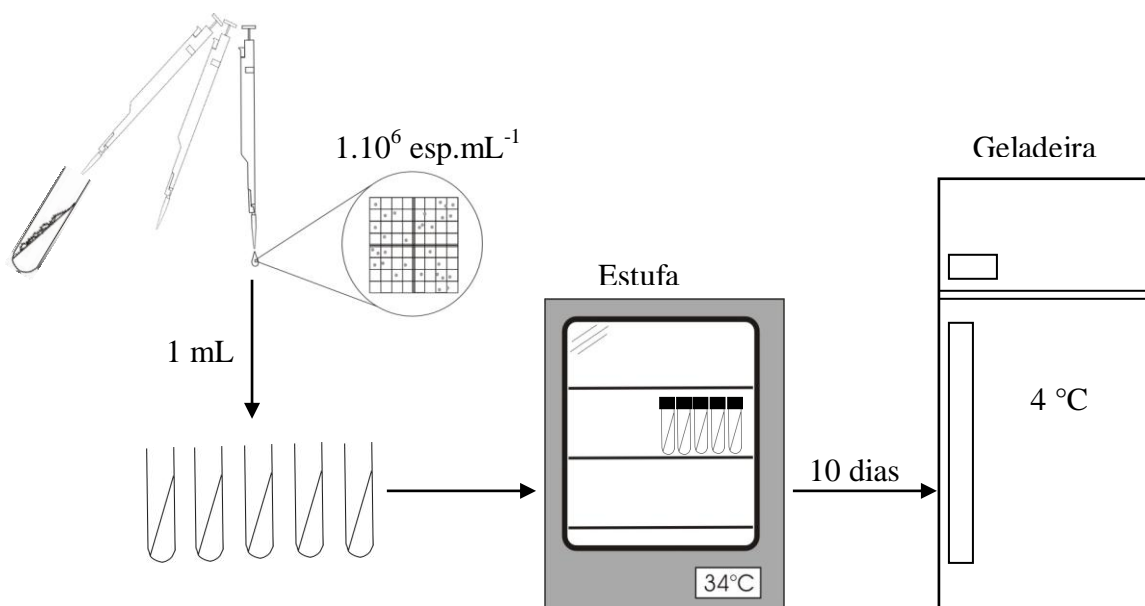


FIGURA 9. Esquema para manutenção do fungo *R. oryzae*.

3.3. Produção do Inóculo para o Biorreator

Primeiramente adicionaram-se 50 g de arroz branco parbolizado (peso seco) em frascos Erlenmeyer de 250 mL. O experimento foi realizado em triplicata e dividido em 3 grupos, onde ao primeiro grupo (grupo A) foram adicionados 25 mL de água destilada, 30 mL ao segundo grupo (grupo B) e 35 mL ao terceiro grupo (grupo C), deixando todos repousarem por um período de aproximadamente 12 horas.

Após esterilização em autoclave a 121°C durante 20 min, cada frasco foi inoculado com 5 mL de uma suspensão de esporos com $1.10^6 \text{ esporos.mL}^{-1}$. Esta suspensão foi obtida a partir do cultivo do *R. oryzae* em um erlenmeyer de 500 mL durante um período de 10 dias com 100 mL de meio de cultivo A. Após isso, acrescentou-se 100 mL de água destilada esterilizada e agitou-se vigorosamente com o auxílio de uma alça de platina (FIGURA 10).

Com o acréscimo desta suspensão de esporos aos erlenmeyers de cada grupo, as umidades finais do substrato nos grupos A, B e C foram respectivamente de 60 %, 70 % e 80 %. (p/p, base seca)

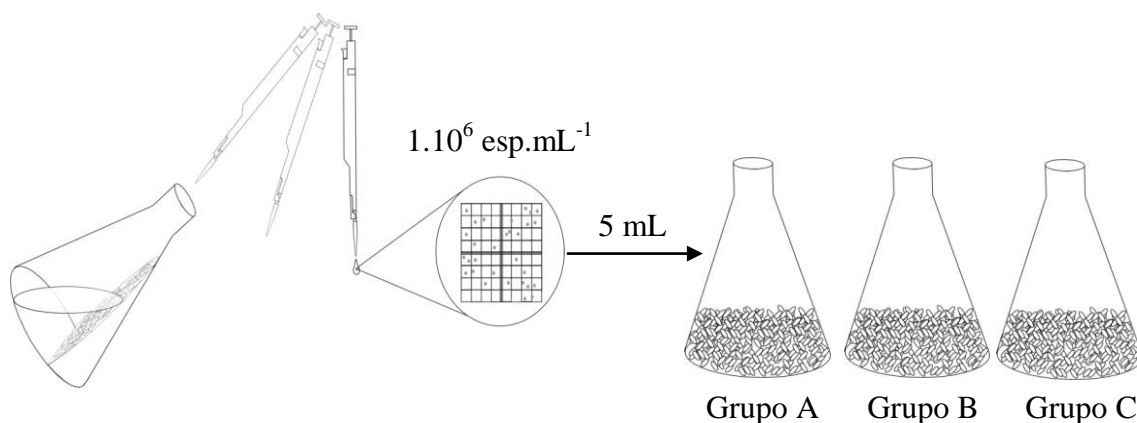


FIGURA 10. Procedimento para otimização da produção de esporos

Com isso, os frascos de cada grupo foram incubados a 34° C durante um período de 10 dias. Para o preparo da suspensão de esporos de cada grupo foram adicionados 100 mL de água destilada esterilizada em cada frasco, sendo necessário raspar vigorosamente a superfície da biomassa sobre o arroz. Desta forma, a suspensão de esporos obtida foi armazenada em um recipiente estéril, repetindo-se este procedimento por mais duas vezes, resultando em uma suspensão de esporos de 300 mL por frasco. As suspensões foram nomeadas como suspensão A, suspensão B e suspensão C de acordo com o grupo de onde foi obtida.

3.4. Contagem de Esporos

Para determinação da concentração da suspensão de esporos utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Nikon). Considerou-se para contagem 16 quadrados que possuem 25 quadrículas com uma área de 0,0025 mm² e profundidade de 0,1 mm para cada quadrícula. Com isso temos um volume total de 0,1 mm³ = 0,1 µL (FIGURA 11).

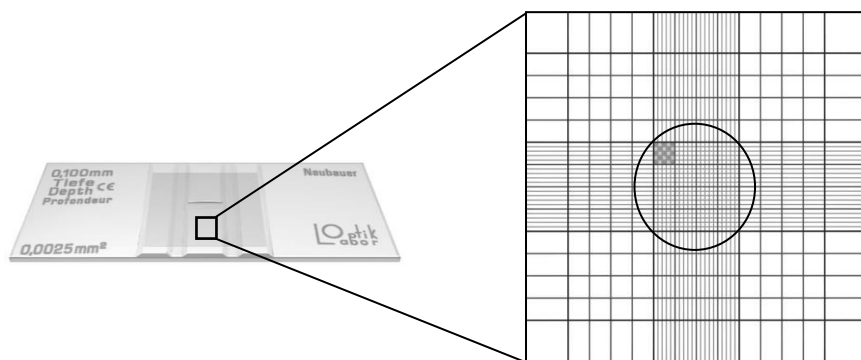


FIGURA 11. Câmara de NeuBauer.

Para a contagem de esporos dilui-se a suspensão obtida. Então, a suspensão diluída foi colocada com o auxílio de uma micropipeta estéril entre a câmara de NeuBauer e uma lamínula que foram previamente limpas com álcool 70 %. Desta forma, preencheu-se o volume da câmara de NeuBauer por capilaridade e assim foi realizada a contagem dos 16 quadrados sempre seguindo as quadriculas em “zig-zag” para facilitar a contagem conforme a FIGURA 12.

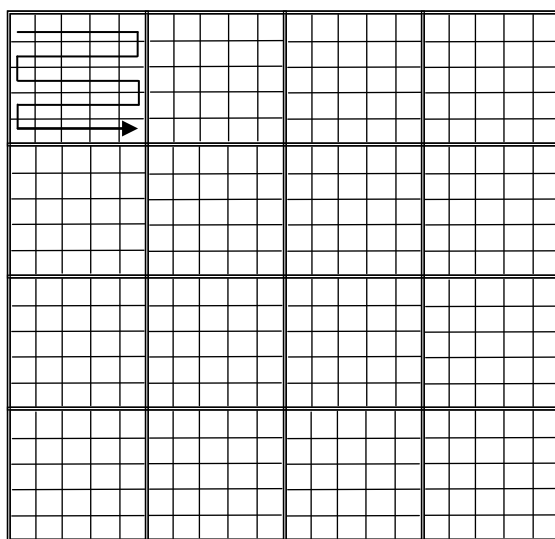


FIGURA 12. Contagem de esporos na câmara de NeuBauer em “zig-zag”.

Com o número total de esporos foi possível utilizar a Eq. (1) para então obtermos a concentração dos esporos obtidos da solução original.

$$\left[\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right] = \frac{n^{\circ} \text{esporos sobre os 16 quadrados}}{10^{-4} \text{ mL}} \times \text{Fator de diluição} \quad (1)$$

$$\text{Volume dos 16 quadrados} = 10^{-4} \text{ mL}$$

3.5. Determinação da Umidade

Para determinar a umidade do substrato ϕ_s (g-água.g-sólido-seco⁻¹), para o levantamento das isotermas dos substratos e para monitoramento da umidade durante o cultivo do fungo *R. oryzae* no biorreator, as amostras foram colocadas em placas de *Petri* previamente pesadas e

numeradas. Durante os experimentos as amostras foram pesadas e destes valores foram subtraídos os pesos das placas para fornecer somente o peso das amostras úmidas.

A determinação do peso seco foi feita através da secagem das amostras numa estufa a 65 °C, com circulação de ar, até que as amostras atingiram peso constante. Desta forma, foi possível determinar a umidade do substrato conforme a Eq. (2):

$$\varphi_s = \left(\frac{\text{peso amostra úmida} - \text{peso amostra seca}}{\text{peso amostra seca}} \right) \quad (2)$$

φ_s = umidade do substrato (kg-água.kg-sólido-seco⁻¹)

3.6. Experimento para Determinação da Isoterma do Substrato

O procedimento experimental, realizado em triplicata para determinação da isoterma, consistiu em preparar soluções salinas com atividades de água conhecidas. Nesse caso, como a temperatura no experimento é uma variável, optou-se pelo uso de soluções insaturadas de NaCl que possuem sua atividade de água constante independente da temperatura devido a concentração de sal ser uma relação entre a massa de sal e a massa de solvente. A TABELA 2 mostra a concentração das soluções salinas insaturadas de NaCl e sua respectiva atividade de água.

TABELA 2. Atividades de água de soluções insaturadas de NaCl para diferentes concentrações: valores propostos como padrões na faixa de 15-65°C.

Solução de NaCl Insaturado (mol . kg de solvente ⁻¹)	Atividade de Água (a _w)
2,5	0,913
2	0,932
1,4	0,953
0,7	0,971
0,3	0,99

(CHIRIFE; RESNIK, 1984)

Para os experimentos conduzidos nas temperaturas de 35 °C, 45 °C e 55 °C acidificou-se o meio para tentar impedir o crescimento de um eventual contaminante durante o período de equilíbrio. Neste caso foi utilizada uma solução de água destilada, acidificada com ácido láctico até o pH de 3,33. O substrato foi então imerso nesta solução por um período de 24 horas e depois o excesso de solução foi drenado.

Então, para cada recipiente foram pesadas aproximadamente três gramas do substrato úmido, tratado com a solução de ácido láctico, nas placas de *Petri*, sendo fechadas com papel alumínio e levadas para a autoclave a 121 °C por um período de 20 minutos. O substrato foi então colocado em recipientes que continham soluções salinas com atividades de água de: (1) 0,913, (2) 0,932, (3) 0,953, (4) 0,971, (5) 0,990.

Desta forma, as amostras foram colocadas sobre suportes a fim de evitar o contato com as soluções de sais no fundo dos recipientes, representado na FIGURA 13. Os recipientes com as amostras foram então fechados hermeticamente e levados à estufa para determinação da isoterma do substrato em diferentes temperaturas de 35, 45, 55 °C, que foram mantidas constantes até o equilíbrio da umidade entre a fase gasosa e a fase sólida. Para isso, essas amostras foram pesadas semanalmente para determinação da massa de substrato úmido, sendo necessário um período de aproximadamente de 14 a 21 dias até que fosse atingido o equilíbrio. Após isso, as amostras foram para uma estufa à temperatura de 65 °C para secagem, com circulação de ar, durante um período de cinco dias para a determinação da massa de substrato seco e conseqüentemente determinação da umidade.

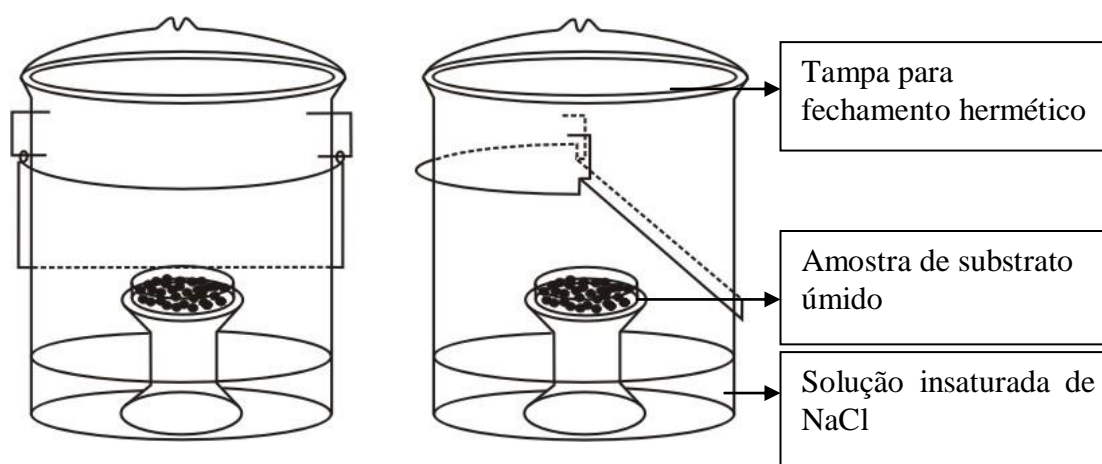


FIGURA 13. Materiais utilizados na determinação da isoterma.

3.7. Determinação do Calor Específico do Substrato.

O calor específico do substrato seco (c_{ps}) é um parâmetro necessário no balanço de energia global da fase sólida no modelo matemático, sendo constante para cada substrato em cada estado físico.

Para a determinação da capacidade calorífica do substrato utilizou-se um calorímetro isolado com isopor. O experimento consistiu na adição de água quente no calorímetro até a estabilização da temperatura, a temperatura da água quente foi então anotada e depois se adicionou o substrato com umidade conhecida na temperatura ambiente. Após estabilizar a temperatura anotou-se a temperatura de equilíbrio, sendo todas as temperaturas determinadas com um termômetro com precisão de 0,1 °C. As massas do substrato e da água quente adicionados foram determinadas utilizando-se uma balança com precisão de 1.10^{-4} g na tentativa de diminuir os erros experimentais.

Sabendo que o produto entre o calor específico e a massa do substrato úmido ($c_{ps\text{ úmido}}$) é uma propriedade aditiva tem-se que:

$$m_{s\text{ úmido}} \cdot c_{ps\text{ úmido}} \cdot (T_{eq} - T_a) + m_w \cdot c_{pw} \cdot (T_{eq} - T_q) = 0 \quad (3)$$
$$c_{ps\text{ úmido}} = \frac{m_w \cdot c_{pw} \cdot (T_q - T_{eq})}{m_{s\text{ úmido}} \cdot (T_{eq} - T_a)}$$

A partir do calor específico do substrato úmido e supondo que não ocorre diferença de entalpia na mistura, pode-se chegar ao calor específico do substrato seco (c_{ps}) através da seguinte equação:

$$m_{s\text{ úmido}} \cdot c_{ps\text{ úmido}} = \left(\frac{m_{s\text{ úmido}}}{\varphi_s + 1} \right) c_{ps} + \left(m_{s\text{ úmido}} - \frac{m_{s\text{ úmido}}}{\varphi_s + 1} \right) c_{pw} \quad (4)$$

Obteve-se o c_{ps} do substrato seco a partir do $c_{ps\text{ úmido}}$ do substrato umido conforme a Eq. (5).

$$c_{ps} = \left[\frac{m_{s \text{ úmido}} \cdot c_{ps \text{ úmido}} - \left(m_{s \text{ úmido}} - \frac{m_{s \text{ úmido}}}{\varphi_s + 1} \right) c_{pw}}{\left(\frac{m_{s \text{ úmido}}}{\varphi_s + 1} \right)} \right] \quad (5)$$

Simplificando a Eq. (5), obtem-se:

$$c_{ps} = \varphi_s \cdot (c_{ps \text{ úmido}} - c_{pw}) + c_{ps \text{ úmido}} \quad (6)$$

nde,

$m_{s \text{ úmido}}$ = massa do substrato úmido (kg);

$c_{ps \text{ úmido}}$ = calor específico do substrato úmido (J . kg⁻¹.°C⁻¹);

c_{ps} = calor específico do substrato seco (J . kg⁻¹.°C⁻¹);

T_a = temperatura ambiente em que se encontrava a soja (°C);

m_w = massa da água (kg);

c_{pw} = calor específico da água (J . kg⁻¹.°C⁻¹);

T_{quente} = temperatura da água quente (°C);

T_{eq} = temperatura final de equilíbrio (°C);

φ_s = umidade do substrato (kg-água. kg-sólido-seco⁻¹).

3.8. Densidade do Substrato

A densidade do substrato úmido (ρ_{su}), tendo no sistema internacional a unidade padrão de quilograma por metro cúbico (kg.m⁻³), é uma propriedade utilizada para se determinar a massa inicial de substrato seco (m_s) no modelo.

Para evitar erros durante a determinação do volume devido à adsorção de água pelo substrato seco durante o experimento, o mesmo foi deixado imerso em excesso de água por 24 horas e assim determinou-se a densidade para o substrato úmido saturado. Após isso, realizou-se o experimento em triplicata utilizando-se uma proveta de 200 mL com precisão de 1 mL para a determinação da densidade do substrato úmido saturado.

Para isso, foi utilizado um procedimento bastante simples para se determinar a densidade de cada substrato. Primeiramente, em uma proveta adicionou-se um determinado volume de

água. Então adicionou-se na proveta uma massa conhecida de substrato úmido. Desta forma, foi possível determinar o volume ocupado para uma determinada massa de substrato através da diferença entre o volume final e o volume inicial obtidos na proveta.

3.9. Porosidade do Leito do Substrato

A porosidade do leito (ε) é um parâmetro importante, pois através dele podemos estimar a compactação do leito e estabelecer o volume da fase gasosa do leito.

O procedimento para determinação da porosidade do leito (m^3 de espaço vazio. m^{-3} de leito) consistiu na adição do substrato, previamente hidratado em excesso de água por um período de 24 horas, em uma proveta de 200 mL. Após a adição do substrato até o volume de 100 mL, adicionou-se 100 mL de água destilada e agitou-se para eliminação do ar presente nos poros do leito. Depois de aproximadamente 2 horas, com o assentamento do substrato, foram medidos o volume ocupado pelo leito e o volume da água presente no leito (FIGURA 14).

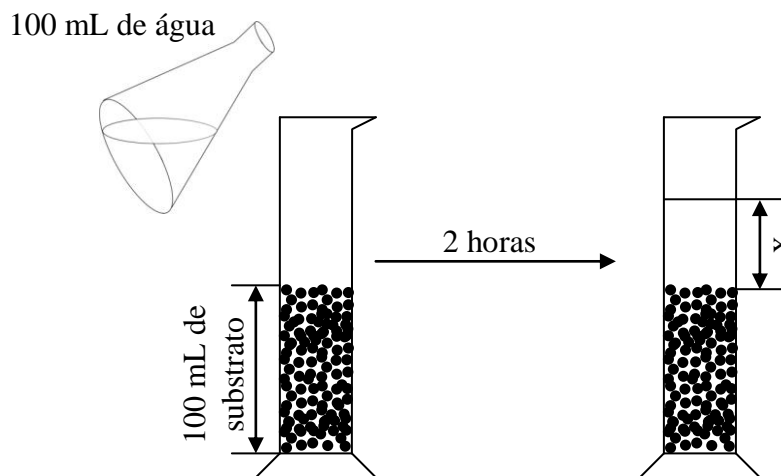


FIGURA 14. Experimento para determinação da porosidade.

Sabendo o volume ocupado pelos poros no leito e a diferença entre o volume de água adicionada e a água acima do leito, utilizou-se a Eq. (7) para determinar a porosidade do leito.

$$\varepsilon = \left(\frac{100 \text{ mL} - x}{100 \text{ mL de leito}} \right) \quad (7)$$

ε = porosidade do leito (m^3 -espaço-vazio . m^{-3} -leito);

x = volume de água acima do volume ocupado pelo leito de substrato (mL).

3.10. Procedimentos Operacionais Padrão

Para cada etapa do processo e operação dos equipamentos, foi feito um procedimento operacional padrão (POP) para auxiliar os operadores a operarem cada equipamento.

O uso desses POPs tem como objetivo evitar que ocorram danos aos equipamentos e principalmente diminuir os riscos em relação a acidentes através do uso adequado e correto de equipamentos de proteção individual (EPI) (ANEXO I).

3.11. Processo de Cultivo do Fungo *R. oryzae* em Biorreator de Escala Piloto

Foram realizados quatro experimentos que consistiram no cultivo do fungo *R. oryzae* em biorreator de escala piloto. Nesses experimentos foram obtidos dados de variáveis durante o crescimento do microrganismo, tais como a umidade do leito e a temperatura do leito, sendo que a última foi monitorada através de um sistema de aquisição de dados desenvolvido em *Labview* (National Instruments) A partir desses dados foram comparados os resultados experimentais em relação aos dados gerados por um modelo matemático, implementado em *Fortran*, proposto para estimativa indireta *on-line* da umidade do leito a partir dos dados de temperatura do leito que são monitorados durante o processo.

3.11.1. Sistema de Aeração e Umidificação do Ar

O ar foi injetado no biorreator através de um soprador, sendo possível alterar manualmente a vazão de ar injetado de acordo com as necessidades do processo. O ar injetado foi então esterilizado através de um sistema de filtração composto primeiramente com um filtro de lã de vidro e um microfiltro pregueado com poros de 0,2 μm de diâmetro, posicionados de acordo com a FIGURA 15.

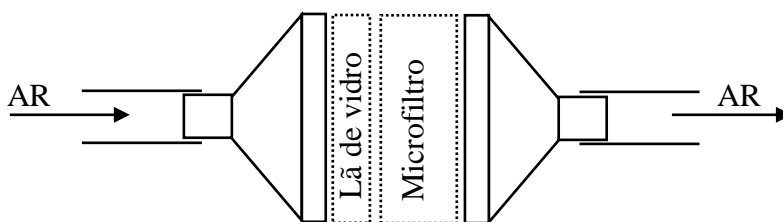


FIGURA 15. Sistema de filtração do ar.

Após ser filtrado, umidificou-se o ar através de um sistema composto por duas caixas de água de 1200 L e uma torre de umidificação.

Durante o processo de cultivo uma das caixas foi mantida a temperatura entre 30-35 °C, sendo está a temperatura ótima de crescimento do microrganismo, e a outra numa temperatura de 20-25 °C, ou seja, a temperatura ambiente. As temperaturas das caixas de água foram controladas e mantidas com a utilização de termostatos e duas resistências de 1500 W através de um sistema “liga-desliga”.

Após 24 horas para o aquecimento da água, ligou-se a bomba que transfere água até o topo da torre na qual flui por toda a coluna até ser captada no fundo e circulada até a caixa de água de origem, fechando um circuito.

O ar por sua vez foi soprado por baixo da coluna, saindo no topo quase saturado (com umidade de aproximadamente 98-99 %) e com temperatura próxima a temperatura da caixa de água, tendo uma temperatura do ar de saída de 1-2 °C menor em relação a temperatura da água da caixa (FIGURA 16).

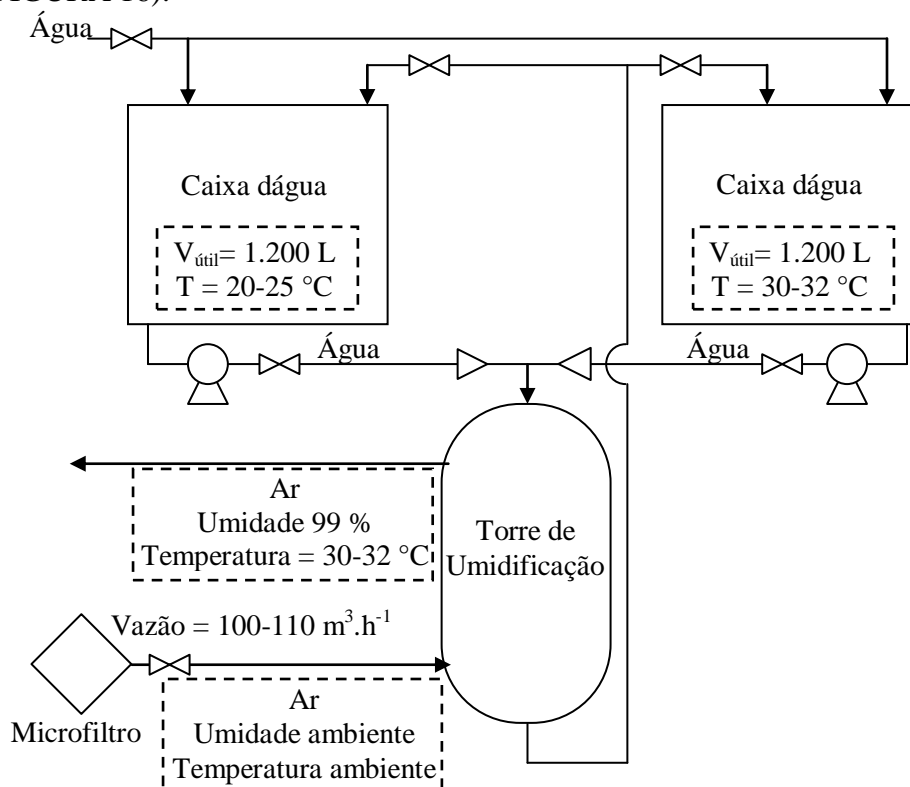


FIGURA 16. Sistema de umificação do ar.

3.11.1.1. Limpeza do Sistema de Umidificação

Para a limpeza das caixas de água, primeiramente utilizou-se um detergente comercial e após o enxágüe adicionou-se 5 litros de hipoclorito de sódio comercial (Q'boa) e 1000 L de água. Com isso, circulou-se esta solução durante 1 hora pela torre de umidificação através do acionamento das bombas.

3.11.2. Descrição do Biorreator de Escala Piloto

O biorreator consiste em um cilindro de aço inox AISI 306 onde o substrato fica sobre uma base retangular perfurada, na qual o ar é injetado abaixo da base e flui no sentido do fundo para o topo do leito, conforme mostrado na FIGURA 17.

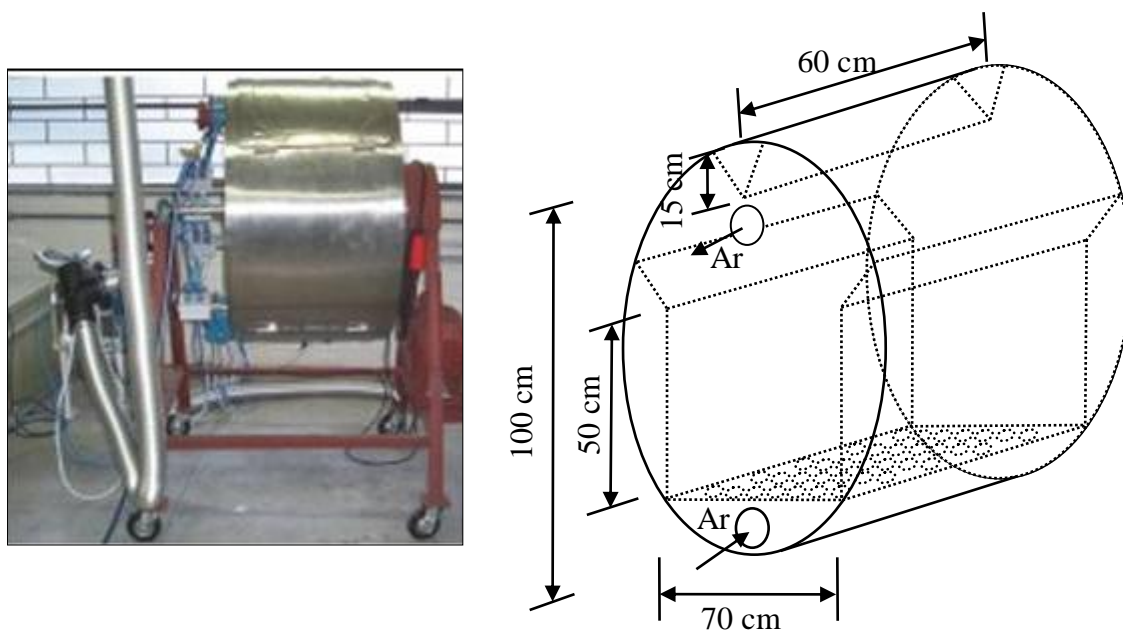


FIGURA 17. Representação do biorreator.

O substrato no biorreator permanece estático durante a maior parte do tempo, porém em certos períodos ocorre a mistura do substrato através da rotação do biorreator ao redor do seu próprio eixo. Durante o período estático o biorreator comporta-se como um leito fixo, ocorrendo gradientes de temperatura axiais devido à aeração forçada que ocorre no leito. O gradiente de temperatura aumenta a capacidade do ar em transportar água, causando a secagem do substrato, mesmo com utilização de ar saturado na entrada. Com isso, a agitação

do leito torna-se importante para homogeneizar novamente o substrato e para restabelecer, em certos casos com a adição de água, a umidade do sólido necessária para o crescimento do microrganismo. Conseqüentemente a agitação do leito também auxilia em uma distribuição mais uniforme da água enquanto a mesma está sendo adicionada ao substrato.

Esta agitação intermitente é potencialmente menos prejudicial para o micélio do microrganismo do que uma agitação contínua o qual provoca tensões de cisalhamento nas hifas de fungos filamentosos e conseqüentemente afeta o crescimento do microrganismo.

A agitação intermitente pode ser utilizada também para limitar a queda de pressão. Isto acontece devido ao crescimento do fungo entre as partículas que dificulta o escoamento do ar que está sendo injetado, causando essas altas quedas de pressão. Então, a agitação tem a finalidade de quebrar as hifas do para permitir a passagem novamente do ar nos espaços entre partículas.

3.11.2.1. Esterilização do Biorreator

Para esterilização do biorreator utilizou-se vapor fluente durante 1 hora que foi gerado na autoclave e levado para o biorreator através de uma mangueira. A mangueira foi acoplada na entrada de ar situada no fundo do biorreator e a saída de ar situada no alto foi aberta para a saída do vapor.

3.11.3. Instrumentos e Sistema para Aquisição de Dados

Para o monitoramento da temperatura do processo de cultivo, os dados de temperatura do ar de entrada e saída foram adquiridos através de 2 transmissores RHT (Novus), com saída de 4-20 mA, conectados a um módulo 7017C com 8 canais (ICP-DAS). A temperatura do leito foi por sua vez medida através de 16 termopares do tipo T (Ecil) conectados a 2 módulos 7018 com 8 canais cada (ICP-DAS), que atuaram como conversores específicos para os sinais obtidos dos termopares e forneceram medidas diretas de temperatura (°C). Ambos os módulos foram conectados a um módulo concentrador 7024 (ICP-DAS) e para a conversão do sinal RS-232 para RS-485 para comunicação com o microcomputador foi utilizado o módulo 7520 (ICP-DAS).

3.11.3.1. Posicionamento e Calibração dos Termopares no Leito do Biorreator

O biorreator possui quatro pontos de medição instalados nas alturas de 5, 18, 33 e 46 cm, posicionados ao longo do eixo vertical, conforme mostrado na FIGURA 18, para monitoramento dos gradientes de temperatura.

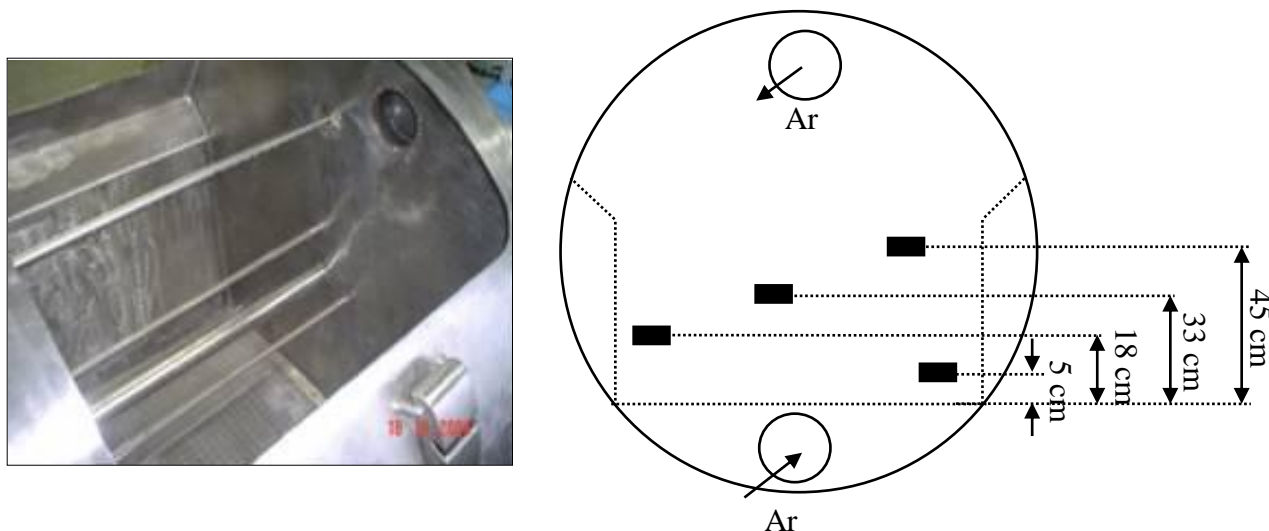


FIGURA 18. Disposição dos módulos de termopares no biorreator na vertical.

Cada ponto deste contém quatro termopares do tipo T que foram dispostos horizontalmente, um seguido do outro, ao longo do biorreator, como observado na FIGURA 19.

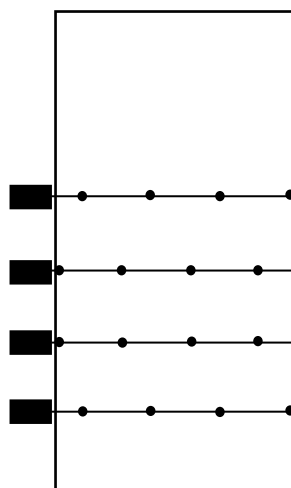


FIGURA 19. (•) Disposição dos termopares no biorreator ao longo do eixo horizontal.

Para calibrar os termopares adicionou-se água aquecida no biorreator nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 °C. A temperatura da água foi então medida com termômetro de precisão e

comparada com os resultados obtidos pelos termopares, que foram registrados no programa elaborado no *software Labview*. O valor da diferença entre a temperatura da água medida no termômetro e a temperatura registrada pelo programa foi inserida no programa para correção e calibração dos termopares. Esses termopares foram posicionados no biorreator de modo a apresentarem no programa a sequência correta das temperaturas medidas do fundo ao topo do leito.

3.11.3.2. Ambiente e Sistema para Aquisição de Dados

Para o desenvolvimento do programa em plataforma *Labview 7.1*, que foi feito no presente trabalho, foi utilizado um computador com processador Intel Pentium 4 2.8 GHz, com 256 MB de memória RAM e sistema operacional Windows XP (Microsoft).

A plataforma *Labview 7.1* foi escolhida por ser uma linguagem de programação gráfica e uma ferramenta de fácil utilização para comunicação dos módulos (*hardware*) com o microcomputador.

Através da utilização das bibliotecas, (I700.dll e uart.dll), fornecidas pelos fabricantes dos módulos de aquisição de dados (ICP-DAS), foi possível reconhecer os módulos através de estruturas no Labview 7.1 denominadas "Call library nodes". Após isso foi necessária a configuração adequada para reconhecimento dos sensores através da configuração de endereço de cada módulo e o canal correspondente para cada sensor.

Para os transmissores RHT, foram obtidos sinais de 4-20 mA do módulo 7017C que correspondem linearmente a 0-100% de umidade relativa e 0-100 °C. Os sinais dos termopares tipo T são adquiridos na unidade de temperatura desejada, dependendo da configuração dos módulos 7018.

O programa foi construído em uma tela principal (FIGURA 20), que apresenta a disposição dos termopares no leito e dos transmissores RHT com sua medição atual. Há também um campo para seleção do intervalo de leitura dos dados que serão gravados no arquivo de saída, o tempo decorrente do experimento em segundos e dois sinalizadores para informar caso a temperatura ou a umidade alcance um valor limitante para o crescimento do microrganismo.

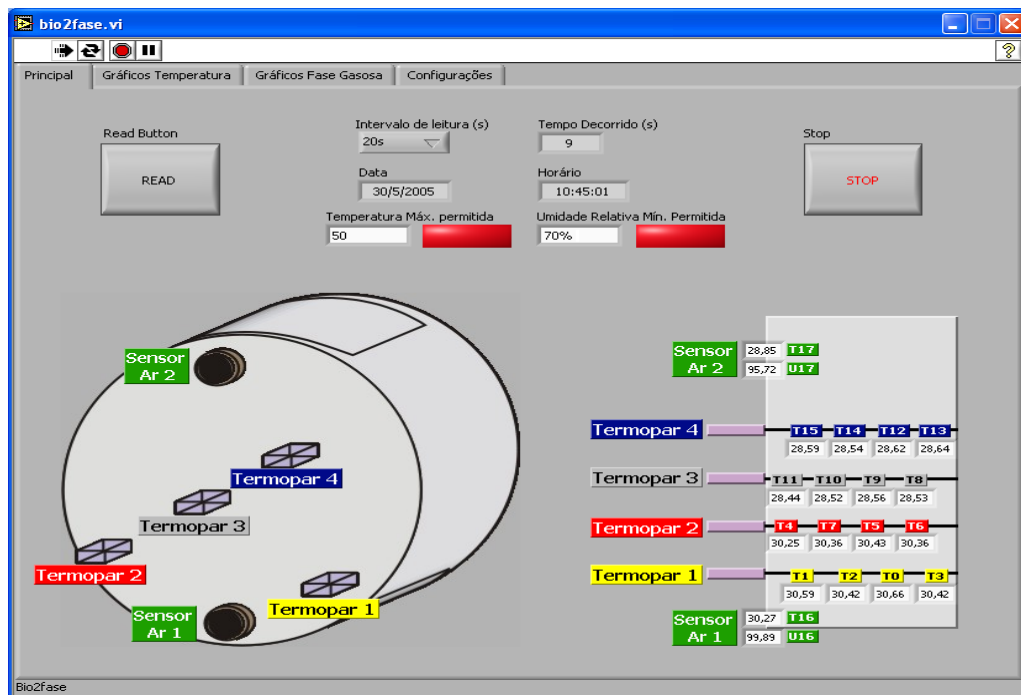


FIGURA 20. Tela principal do programa de aquisição de dados.

As demais telas apresentam os gráficos de temperatura do leito para cada termopar e a tela de gráficos para as temperaturas do ar de entrada e saída. Em ambos os casos é possível redimensionar o gráfico para se obter uma melhor visualização dos dados (FIGURAS 21 e 22).



FIGURA 21. Gráficos dos resultados de monitoramento do ar de entrada e saída.

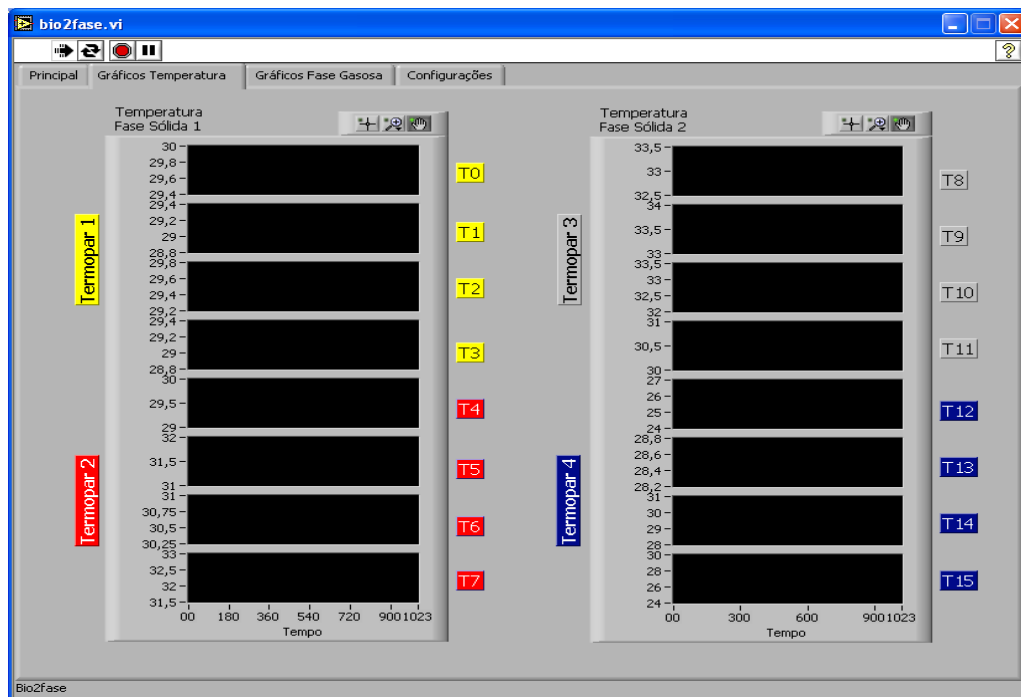


FIGURA 22. Gráfico das temperaturas obtidas de cada termopar.

A tela de configuração (FIGURA 23) consistiu na inserção de parâmetros da configuração dos módulos para obtenção dos sinais de cada sensor. Nesta janela pode ser inserido o valor determinado na calibração de cada termopar T, conforme descrito na seção 3.11.3.1.

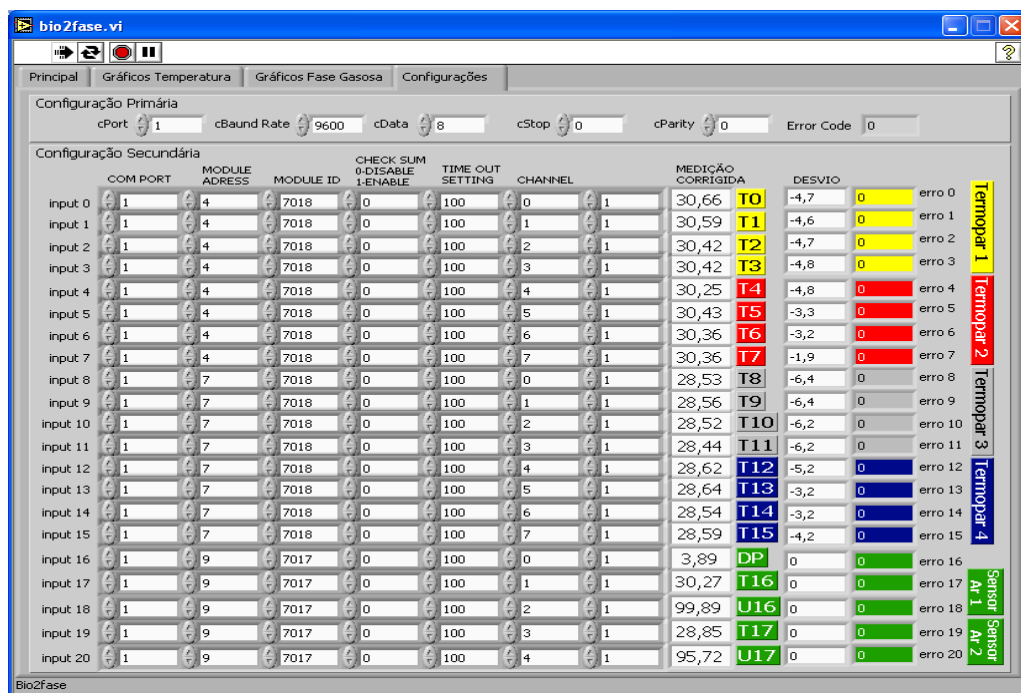


FIGURA 23. Configuração de endereço e calibração dos sensores.

A etapa de configuração dos sensores foi uma etapa muito importante para a obtenção de valores confiáveis e principalmente para evitar erros sistemáticos devido à incorreta calibração dos termopares. Além disso, os erros mostrados para cada sensor se referem aos erros grossos que podem ocorrer durante o experimento. Esses erros grosseiros podem ser gerados pela quebra dos módulos, desconexão dos sensores ou pela falta de energia.

3.11.4. Cultivo do Fungo *R. oryzae* no Biorreator de Escala Piloto

3.11.4.1. Preparo do Substrato

Nos experimentos de cultivo utilizou-se trigo moído e soja descascada bipartida (Jasmine Alimentos Ltda.) como substrato. Com isso, colocou-se em média 10 kg de substrato em sacos plásticos duplos de 100 L para evitar que os sacos rasgassem durante sua transferência da autoclave para o biorreator.

Adicionou-se água na proporção desejada e nas primeiras 8 horas agitou-se a mistura de água e substrato para que houvesse uma absorção homogênea da água. Após a homogeneização, deixou-se a mistura repousar por um período de 12 horas (overnight).

Esse substrato foi então esterilizado em autoclave durante 20 min a 121 °C, e esperou-se esfriar até a temperatura de 30-34 °C. Após o resfriamento cada saco foi transferido da autoclave para o biorreator com o auxílio de luvas de proteção.

A eficiência do método de esterilização por calor úmido dos substratos utilizados nos experimentos foi determinada através da utilização de um bioindicador composto por uma solução de esporos de *Bacillus stearothermophilus* que são termoresistentes. As ampolas contendo a solução de esporos com nutrientes (Sterikon – Merck) foram então colocadas em diferentes posições na autoclave durante o processo de esterilização do substrato. Após o processo de esterilização, as ampolas foram incubadas em estufa a 60-70 °C, sendo esta a temperatura ótima para crescimento do *B. stearothermophilus*. Com a incubação dos esporos, depois de 24 horas analisou-se a cor da solução. Caso a solução mudar da cor azul, púrpura para amarela isso demonstra o crescimento do bioindicador e que o processo de esterilização não foi adequado.

3.11.4.2. Inoculação do Substrato

Com a transferência do substrato da autoclave para o biorreator, esperou-se a temperatura do leito atingir aproximadamente 30-34 °C e inoculou-se o substrato com uma suspensão de esporos de *Rhizopus oryzae* preparada no mesmo dia.

Foram utilizados em torno de 2,5-5,0 L de uma suspensão de esporos de concentração de aproximadamente $2 \cdot 10^8$ esporos.mL⁻¹, conforme descrito da seção 3.3. A inoculação foi feita por camadas utilizando-se um pulverizador manual e agitando-se com uma pá para obter uma melhor homogeneização (FIGURA 24).



FIGURA 24. Inoculação dos esporos no biorreator.

3.11.4.3. Monitoramento Experimental da Umidade e Temperatura do Leito

Após a inoculação, o biorreator foi então fechado e o sistema de umidificação de ar ligado. A vazão de ar de entrada foi ajustada para 100-105 m³.h⁻¹. Após estabilização das temperaturas dos termopares no processo, realizou-se a primeira coleta de substrato para determinação da umidade, conforme seção 3.5.

Utilizando um instrumento construído especialmente para essa finalidade (FIGURA 25), foram retiradas amostras do substrato de 5 em 5 cm de profundidade. Para uma altura inicial do leito nos experimentos de 30-35 cm, foram retiradas de 6 a 7 amostras que foram colocadas em placas de *Petri*, previamente pesadas, devidamente numeradas e lacradas com filme plástico para posterior determinação da umidade. A amostragem para determinação da umidade do leito foi feita em triplicata.

A cada 4 horas eram feitas novas coletas de substrato no biorreator, no mesmo molde da primeira coleta. Neste caso, também se verificou a vazão e a temperatura do ar de entrada.

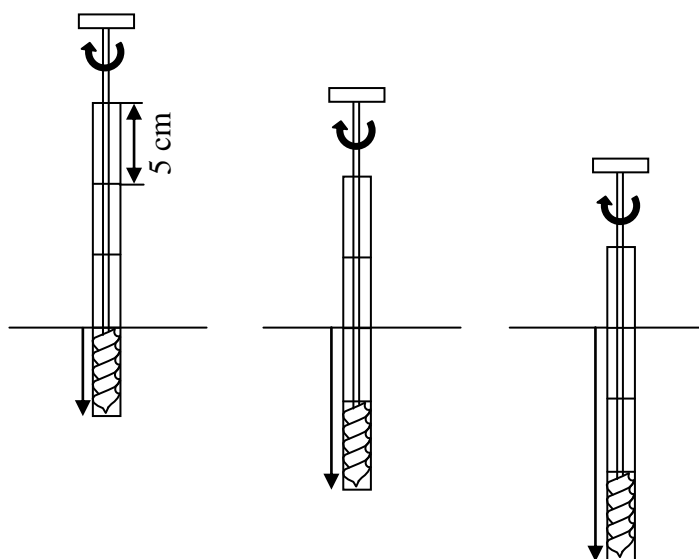


FIGURA 25. Seqüência de coleta de amostra para uma mesma posição.

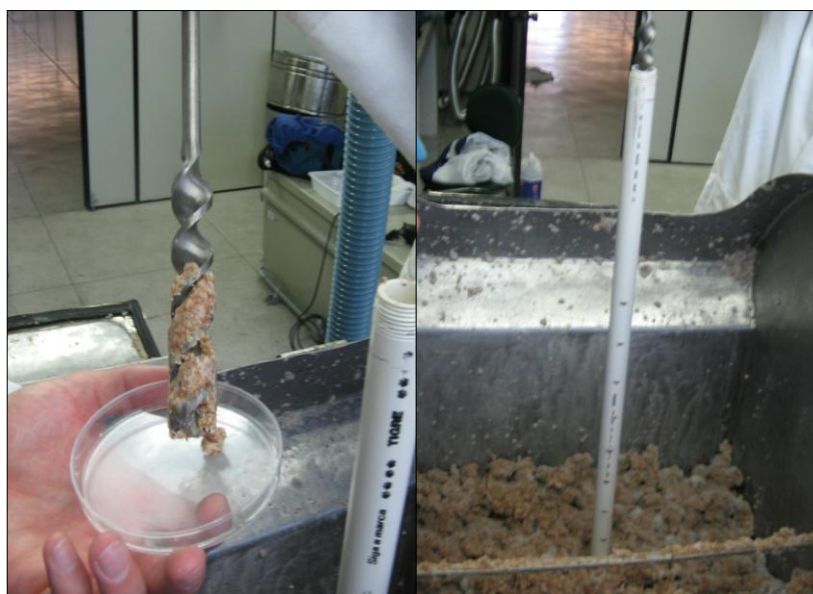


FIGURA 26. Coleta da amostra.

Com o início do experimento, iniciou-se também o monitoramento das temperaturas pelo sistema de aquisição de dados, sendo os resultados gravados continuamente.

3.11.4.4. Agitação do Biorreator

Durante os experimentos realizou-se a agitação do leito como uma estratégia de homogeneização da umidade do leito. Procedeu-se a agitação durante pelo menos 15-20 min e com uma frequência de aproximadamente 20 rpm controlada através do inversor de frequência do motor. Desta forma, para a agitação do corpo do biorreator foi necessário desconectar primeiramente os cabos dos termopares, em seguida as mangueiras de ar e fechar as respectivas válvulas de entrada e saída.

As mangueiras de ar foram colocadas sobre o suporte específico, o que permitiu o acionamento do motor através do botão no painel de controle.

Antes e após cada período de agitação realizou-se uma nova coleta de amostra do substrato para determinação da umidade. Em seguida foram reconectadas as mangueiras e os cabos dos termopares para reinício do cultivo e monitoramento da umidade e temperaturas do leito.

4. DESENVOLVIMENTO DO MODELO MATEMÁTICO

O modelo desenvolvido tem por objetivo estimar as variações e gradientes da umidade do leito a partir do monitoramento dos gradientes de temperatura que ocorrem no leito e da temperatura do ar de entrada em um biorreator de escala piloto operado com agitação intermitente e aeração forçada. Os dados de temperatura monitorados e utilizados pelo modelo passam antes por um filtro de dados demonstrados a seguir.

4.1. Filtro de Dados

A eliminação dos ruídos provenientes da medição dos instrumentos utilizados, principalmente os termopares do tipo T, é uma etapa importante para diminuir a influência desses ruídos no sistema de determinação indireta da umidade através do método *soft-sense*. Além disso, as tomadas de medições dos termopares próximos à parede do biorreator não foram consideradas por não representarem os fenômenos que ocorrem no interior do leito, pois próximo a parede ocorre transferência de energia significativa por condução do leito com o meio externo o qual não é considerada no modelo (MITCHELL E VON MEIN, 2000). A estratégia para o filtro de dados se baseou em uma série composta por quatro filtros, conforme demonstrado a seguir:

4.1.1. Filtro 1 - Eliminação de Medições em um mesmo Tempo

Devido à alta velocidade de amostragem de dados ($T(t,z)$), temos para um mesmo tempo em segundo, de quatro a cinco leituras. Assim, a função deste filtro é somente considerar o primeiro valor medido pelo sensor para determinado tempo ($T_{f1}(t,z)$), desprezando as demais medições para evitar que ocorram duplicatas de leitura para um mesmo tempo.

4.1.2. Filtro 2 - Eliminação de Variações de Temperatura Menores que a Precisão dos Termopares

O segundo filtro é baseado na sensibilidade e precisão do sensor. Sua principal função é evitar que o programa aceite variações de temperatura obtidas do primeiro filtro ($T_{f1}(t,z)$) menores que a precisão do sensor, neste caso os termopares do tipo T.

Assim, para diminuir o efeito de pequenos ruídos no monitoramento da temperatura, somente é considerada para cada tempo a temperatura que tenha variações superiores 0,5 °C, armazenado a temperatura filtrada neste filtro ($T_{f2}(t,z)$).

4.1.3. Filtro 3 - Filtro Exponencial

Os filtros analógicos têm sido utilizados por vários anos para amenizar os ruídos nos dados experimentais. O terceiro filtro consiste em um filtro exponencial que tem a função de eliminar ruídos de alta frequência, também conhecidos como filtros de passa baixa.

O filtro exponencial é baseado em uma função de transferência de primeira ordem que é equivalente a uma equação diferencial de primeira ordem (Eq. (8)) (SEEBORG, 2004).

$$\tau_F \frac{dy(t)}{dt} + y(t) = x(t) \quad (8)$$

onde x é a variável medida, y é o valor filtrado e τ_F é uma constante de tempo do filtro.

Aplicando a forma derivativa da Eq. (8) no tempo, com passo n , pode-se aplicar diferenças finitas para frente (Eq. (9)).

$$\frac{dy}{dt} = \frac{y_{n+1} - y_n}{\Delta t} \quad (9)$$

Substituindo na Eq. (8), $y(t)$ por y_{n+1} e $x(t)$ por x_{n+1} , temos:

$$\tau_F \frac{y_{n+1} - y_n}{\Delta t} + y_{n+1} = x_{n+1} \quad (10)$$

$$y_{n+1} = \frac{\Delta t}{\tau_F + \Delta t} x_{n+1} + \frac{\tau_F}{\tau_F + \Delta t} y_n \quad (11)$$

Definindo-se:

$$\alpha = \frac{1}{\frac{\tau_F}{\Delta t} + 1}$$

então pode-se escrever,

$$y_{n+1} = \alpha \cdot x_{n+1} + (1 - \alpha) \cdot y_n \quad (12)$$

onde,

x_{n+1} = temperatura filtrada obtida do segundo filtro ($T_{f2}(t,z)$)

y_{n+1} = temperatura filtrada no terceiro filtro ($T_{f3}(t,z)$)

Os valores filtrados são armazenados em matrizes $T_{f2}(i,j)$ e $T_{f3}(i,j)$ para agilizar o cálculo a partir dos valores armazenados na memória, onde i é referente ao tempo (t) e j referente a posição no leito (z).

Com isso, os filtros da temperatura são utilizados para $i \geq 1$, onde $t \neq 0$.

$$T_{f3}(i+1, j) = \alpha \cdot T_{f2}(i+1, j) + (1 - \alpha) \cdot T_{f3}(i, j) \quad (13)$$

Este filtro também pode ser chamado de “*single exponential smoothing*”, e os casos limitantes para α são:

$\alpha = 1$ – Sem filtro, o resultado de saída do filtro será o valor de $T_{f2}(t,z)$

$\alpha \rightarrow 0$ – O valor medido $T_{f2}(t,z)$ é ignorado

4.1.4. Filtro 4 - Média Móvel

O filtro final empregado na série é o filtro referente às médias dos valores anteriores. Este quarto filtro tem como objetivo retornar valores resultantes das médias de um número

específico de resultados anteriores, dando o mesmo peso para cada resultado anterior no cálculo da média.

Este filtro das médias dos valores anteriores pode ser expresso como:

$$y_n = \frac{1}{J} \sum_{i=n-J+1}^n x_i \quad (14)$$

onde J é o número dos dados anteriores que serão utilizados para obter a média, para o foi utilizado J=10. Com base na Eq. (14), pode-se obter uma equação para y_{n+1} , expressa como:

$$y_{n+1} = \frac{1}{J} \sum_{i=n-J+2}^{n+1} x_i \quad (15)$$

Subtraindo a Eq. (15) pela Eq. (14), temos:

$$y_{n+1} = y_n + \frac{1}{J} (x_{n+1} - x_{n-J+2}) \quad (16)$$

onde,

x_{n+1} = temperatura filtrada obtida de terceiro filtro ($T_{f3}(t,z)$);

y_{n+1} = temperatura filtrada ($T_{f4}(t,z)$).

Os valores filtrados pelo quarto filtro são armazenados na matriz $T_{f4}(i,j)$ e para o valor inicial ($t=0$) da temperatura medida, assume-se que $T_{f1}(0,z) = T_{f2}(0,z) = T_{f3}(0,z) = T_{f4}(0,z) = T(0,z)$.

Então, para $i \geq 1$, onde $t \neq 0$, temos:

$$T_{f4}(i+1, j) = T_{f4}(i, j) + \frac{1}{J} (T_{f3}(i+1, j) - T_{f3}(i-J+2, j)) \quad (17)$$

Com o uso desses quatro filtros em série, tentou-se diminuir a influência dos ruídos sobre a medição das temperaturas durante o experimento, que foram utilizadas como variáveis de alimentação do modelo matemático para determinação indireta da umidade do substrato. Na FIGURA 27 temos um fluxograma simplificado de como cada filtro foi empregado:

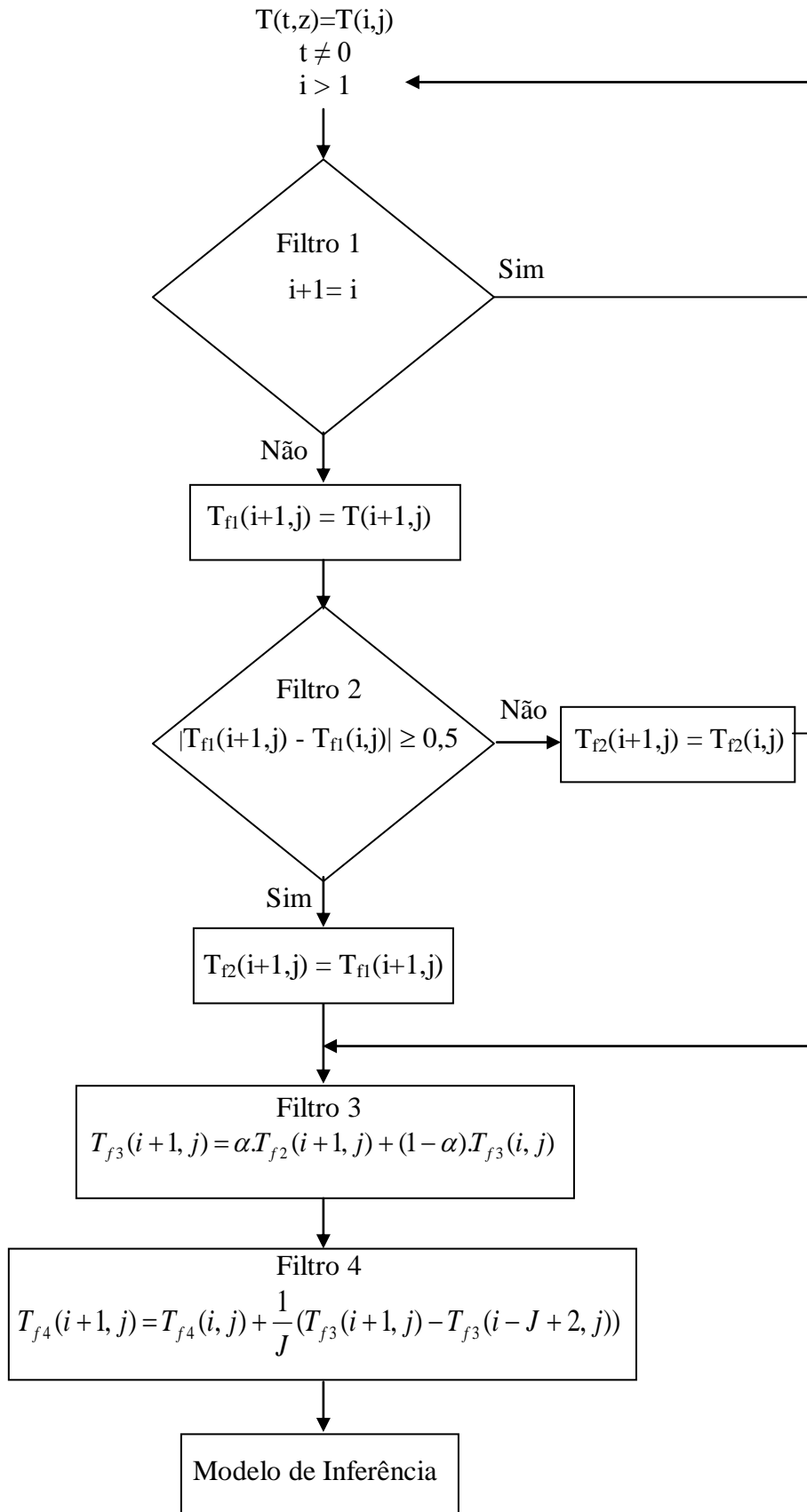


FIGURA 27. Fluxograma dos filtros de dados em série.

4.2. Descrição do Modelo de Inferência

O modelo desenvolvido foi baseado nos fenômenos de transferência de massa e energia que ocorrem dentro do biorreator de FES de escala piloto (FIGURA 28). Durante o crescimento do fungo filamentoso *R. oryzae* em FES, o fungo cresce superficialmente sobre partículas do substrato, consumindo o substrato e o oxigênio do ar que são fatores necessários para desenvolver suas atividades metabólicas, liberando água na forma de vapor, calor metabólico e dióxido de carbono. Como a biomassa produzida é menor do que o substrato consumido, devido à conversão de parte da massa do substrato para formação de gás carbônico e água, a quantidade total de sólidos secos diminui durante o crescimento do fungo. Esta diminuição da massa de substrato não somente influencia na umidade do leito, mas também altera sua geometria, mas para simplificar a modelagem do sistema, a geometria do substrato é considerada constante.

Portanto, o sistema consiste em partículas sólidas de substrato e biomassa circundadas de ar. Nesse sistema foi considerado o fenômeno de transferência de energia e massa que ocorre no leito como a convecção e a evaporação. Neste caso a evaporação exerce um processo fundamental para o resfriamento do leito através de um fenômeno denominado resfriamento evaporativo. A transferência de calor através das paredes do biorreator não é considerada em relação aos outros fenômenos de transferência de calor que ocorrem no interior do biorreator na direção vertical. O modelo descreve o crescimento de uma maneira simples e de forma empírica, considerando somente a produção de calor metabólico obtida pelo balanço de energia através das temperaturas medidas durante o processo. A partir do calor metabólico pode ser obtida a partir da estequiometria de crescimento a produção de água metabólica que influencia no balanço de massa do sistema e com isso na determinação da umidade que pode ser estimada para o leito.

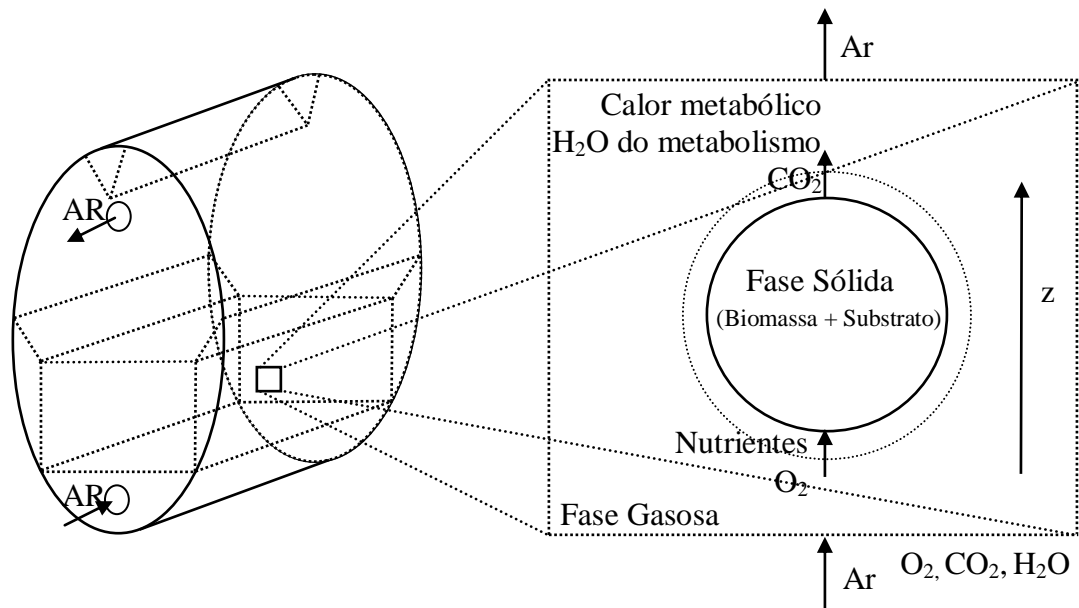


FIGURA 28. Fenômenos de transporte de energia e massa que ocorrem no sistema.

Algumas considerações são feitas para a simplificação do modelo, sendo elas:

- A temperatura da fase sólida está em equilíbrio com a temperatura da fase gasosa que está próxima;
- No final do período de agitação a temperatura em todas as seções divididas do leito, de acordo com a posição dos termopares, retorna para uma temperatura média ponderada de acordo com as temperaturas pré-agitação em cada seção transversal horizontal do leito;
- A atividade de água da superfície da fase sólida está em equilíbrio com a atividade de água da fase gasosa que está próxima;
- Após agitação o leito tem uma umidade média, ponderada em relação à umidade pré-agitação das seções transversais do leito;
- O ar entra e permanece saturado ao longo do leito com umidade relativa de (99%);
- A transferência de energia e massa considerada no sistema ocorre somente ao longo do eixo central por onde o ar flui, que é representado pela letra Z ;
- A porosidade do leito é constante.

4.3. Fenômenos de Transferência de Calor e Massa

Abaixo segue um fluxograma (FIGURA 29) de como cada equação dos balanços de massa e energia foi utilizada para conseguir estimar a umidade do leito a partir das temperaturas em diferentes posições do leito medidas *on-line* durante o cultivo do fungo *R. oryzae*.

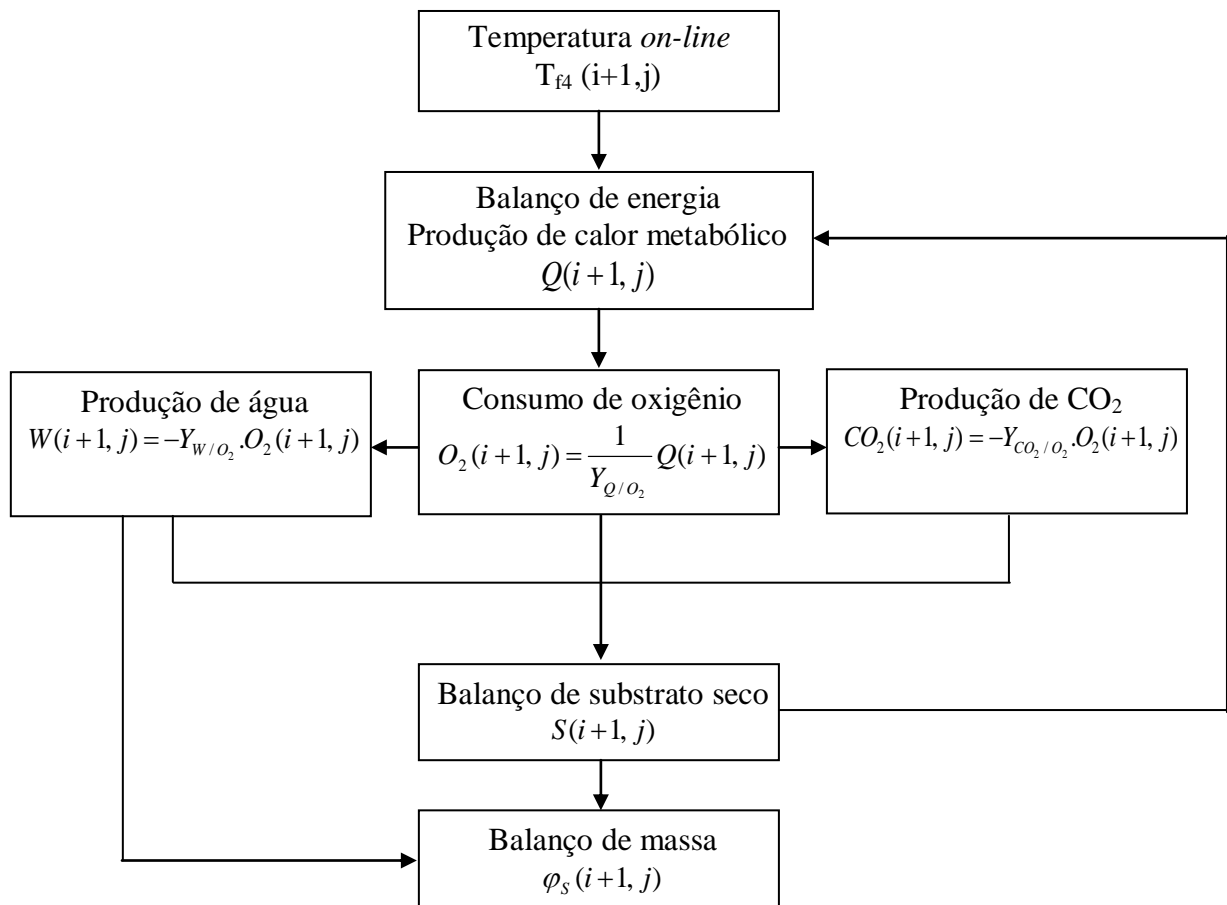


FIGURA 29. Esquema de utilização dos balanços de massa e energia para estimar a umidade do leito a partir das temperaturas medidas *on-line*.

4.3.1. Balanço de Energia Global

Para o balanço de energia global do sistema, consideramos que a temperatura da superfície da fase sólida está em equilíbrio com a temperatura da fase gasosa, onde $T_s(t,z)=T_g(t,z)=T_{f4}(i,j)$ e que a fase gasosa está sempre saturada de acordo com a temperatura. Com isso, temos o seguinte balanço de energia global:

$$\varepsilon \cdot \rho_g \alpha \frac{\partial T}{\partial t} - \alpha \cdot G \frac{\partial T}{\partial z} = S \cdot \beta \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \lambda \frac{\partial H_{sat}}{\partial T} \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \cdot G - \frac{\partial Q}{\partial t} \quad (18)$$

$$\alpha = c_{pg} + \varphi_g \cdot c_{pv}$$

$$\beta = c_{ps} + \varphi_s \cdot c_{pw}$$

ε = porosidade (m³-espaço-vazio . m⁻³);

ρ_g = densidade da fase gasosa (kg-ar-seco . m⁻³);

G = fluxo mássico de ar (kg-ar.m⁻².s⁻¹);

c_{pg} = calor específico do ar seco (J . kg⁻¹.°C⁻¹);

φ_g = umidade da fase gasosa (kg-água . kg-ar-seco⁻¹);

c_{pv} = calor específico do vapor de água (J . kg⁻¹.°C⁻¹);

S = massa de substrato contido no leito (kg - subst. - seco . m⁻³);

c_{ps} = calor específico do substrato seco (J.kg⁻¹.°C⁻¹);

φ_s = umidade da fase sólida (kg - água . kg - subst. - seco⁻¹);

c_{pw} = calor específico da água (J . kg⁻¹.°C⁻¹);

λ = entalpia de evaporação da água (J . kg-água⁻¹);

H_{sat} = umidade de saturação (kg-água . kg-ar⁻¹);

Q = calor metabólico(J . m⁻³);

T = temperatura de equilíbrio (°C⁻¹).

O primeiro termo da Eq. (18) do lado esquerdo refere-se a variação de energia na fase gasosa e o segundo termo representa a variação de energia nas diferentes posições do leito devido a convecção. O primeiro termo do lado direito representa a variação da energia na fase sólida, o segundo termo a variação de energia nas diferentes posições do leito devido ao resfriamento evaporativo, onde λ é a entalpia de evaporação da água e H_{sat} é a umidade de saturação do ar em relação a uma determinada temperatura, e o terceiro termo refere-se ao calor metabólico produzido durante o crescimento do microrganismo.

Separando o último termo do lado direito que se refere ao calor metabólico produzido pelo microrganismo, temos:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = -\varepsilon \cdot \rho_g \alpha \frac{\partial T}{\partial t} + \alpha \cdot G \frac{\partial T}{\partial z} + S \cdot \beta \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \lambda \frac{\partial H_{sat}}{\partial T} \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \cdot G \quad (19)$$

Para o cálculo da umidade de saturação (H_{sat}) utilizamos a seguinte equação:

$$H_{sat} = 0,62413 \cdot \frac{P_w^{sat}}{P - P_w^{sat}} = \frac{0,62413}{\frac{P}{P_w^{sat}} - 1} \quad (20)$$

onde 0,62413 representa a razão entre a massa molar da água e uma média da massa molar do ar seco.

A pressão de saturação parcial é derivada da equação de Antoine (REID et al., 1977)

$$P_w^{sat} = 133,322 \cdot e^{\left(18,3036 - \frac{3816,44}{(T_{f4}(i,j) + 227,02)}\right)} \quad (21)$$

T_{f4} = temperatura filtrada obtida do quarto filtro (equilíbrio entre a fase sólida e gasosa (°C));

P_w^{sat} = pressão parcial de saturação da fase gasosa (Pa).

Isto permite escrever uma equação para a umidade de saturação em termos de temperatura substituindo a Eq. (21) na Eq. (20):

$$H_{sat} = \frac{0,62413}{\frac{P}{133,322 \cdot e^{\left(18,3036 - \frac{3816,44}{(T_{f4}(i,j) + 227,02)}\right)}} - 1} \quad (22)$$

A Eq. (22) pode ser diferenciada para obter uma expressão de dH_{sat}/dT , a qual é utilizada para cálculo da Eq. (19), como o termo que representa a perda de energia devido à evaporação. Para uma pressão total (P, Pa), obtemos (HIMMELBLAU, 1996):

$$\frac{\partial H_{sat}}{\partial T} = \frac{0,62413 \cdot 3816,44 \cdot P}{(T_{f4}(i, j) + 227,02)^2 \cdot \left(\frac{P}{133,322 \cdot e^{\left(\frac{18,3036 \cdot 3816,44}{(T_{f4}(i, j) + 273,15) - 46,13} \right)}} - 1 \right)^2 \cdot 133,322 \cdot e^{\left(\frac{18,3036 \cdot 3816,44}{(T_{f4}(i, j) + 273,15) - 46,13} \right)}} \quad (23)$$

Como as temperaturas obtidas *on-line* pelo sistema de aquisição de dados, não apresentam grande variação em pequenos intervalos de tempo, podemos aplicar o método de diferenças finitas para frente na Eq. (19). Assim, através dos resultados filtrados das temperaturas do leite ($T_{f4}(i, j)$) durante o experimento nas diferentes posições, podemos estimar o calor metabólico produzido pelo microrganismo em um determinado tempo e posição (Eq. (24)).

$$\begin{aligned} \frac{Q(i+1, j) - Q(i, j)}{\Delta t} &= -\varepsilon \cdot \rho_g \alpha \frac{(T_{f4}(i+1, j) - T_{f4}(i, j))}{\Delta t} + \alpha \cdot G \frac{(T_{f4}(i, j) - T_{f4}(i, j-1))}{\Delta z} + \\ &+ S \cdot \beta \cdot \frac{(T_{f4}(i+1, j) - T_{f4}(i, j))}{\Delta t} + \lambda \frac{\partial H_{sat}}{\partial T} \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \cdot G \end{aligned}$$

$$Q(i+1, j) = \left[-\varepsilon \cdot \rho_g \alpha \frac{(T_{f4}(i+1, j) - T_{f4}(i, j))}{\Delta t} + \alpha \cdot G \frac{(T_{f4}(i, j) - T_{f4}(i, j-1))}{\Delta z} + \right. \\ \left. + S \cdot \beta \cdot \frac{(T_{f4}(i+1, j) - T_{f4}(i, j))}{\Delta t} + \lambda \frac{\partial H_{sat}}{\partial T} \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \cdot G \right] \Delta t + Q(i, j) \quad (24)$$

4.3.2. Cálculo do Consumo de Oxigênio e Produção de Gás Carbônico

Os microrganismos utilizam a energia dos substratos, mas como qualquer outro processo, parte da energia presente no substrato é liberada na forma de calor metabólico conforme Eq. (25).



Com isso, baseando-se na reação demonstrada na Eq. (25), o elemento oxidante predominante é o oxigênio, então a geração de calor pode ser associada à taxa de oxidação do substrato e conseqüentemente com a taxa de consumo de oxigênio durante o processo.

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = \frac{1}{Y_{Q/O_2}} \cdot \frac{\partial Q}{\partial t} \quad (26)$$

onde,

Y_{Q/O_2} = fator de conversão de oxigênio a calor metabólico ($J \cdot mol^{-1} O_2$).

Sabendo que o oxigênio aceita quatro elétrons durante o processo respiratório, pode-se determinar assim, a quantidade de energia liberada para o meio a partir da energia presente nos elétrons que corresponde de 108,836 a 129,766 kJ. elétron⁻¹. Assim, temos:

$Y_{Q/O_2} = 519 \text{ kJ} \cdot mol^{-1} O_2$ (BAILEY e OLLIS, 1986)

Assumindo da mesma forma que a produção de gás carbônico em relação ao consumo de oxigênio são próximas durante um cultivo, pois a principal fonte de carbono são carboidratos, e o catabolismo é aeróbio:

$$\frac{\partial CO_2}{\partial t} = -Y_{CO_2/O_2} \cdot \frac{\partial O_2}{\partial t} \cdot MCO_2 \quad (27)$$

onde,

Y_{CO_2/O_2} = fator de conversão do oxigênio em gás carbônico ($mol CO_2 \cdot mol^{-1} O_2$);

MCO_2 = massa molar do gás carbônico ($44g \cdot mol^{-1}$);

$Y_{CO_2/O_2} = 1,0 \text{ mol } CO_2 \cdot mol^{-1} O_2$ (NAGEL et al., 2001).

4.3.3. Cálculo da Produção de Água pelo Microrganismo

Para o cálculo da água produzida, devido o metabolismo do microrganismo, podemos utilizar a mesma Eq. (25). Então, a produção de água metabólica em relação ao consumo de oxigênio será:

$$\frac{\partial W}{\partial t} = -Y_{W/O_2} \cdot \frac{\partial O_2}{\partial t} \cdot MH_2O \quad (28)$$

onde,

Y_{W/O_2} = fator de conversão do oxigênio em água metabólica ($\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{mol}^{-1} \text{O}_2$);

MH_2O = massa molar da água ($18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$);

$Y_{W/O_2} = 1,2 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{mol}^{-1} \text{O}_2$ (NAGEL et al., 2001).

A produção de água metabólica é considerada como um termo importante no balanço de água para o leito e pode ser determinada indiretamente pelo calor metabólico produzido pelo crescimento que é determinado através do balanço de energia (Eq. (18)).

4.3.4. Balanço de Sólidos Secos

Para o balanço de sólidos secos totais consideramos somente o substrato seco e a biomassa seca produzida. O oxigênio é então incorporado à biomassa sendo produzidos gás carbônico e água conforme a Eq. (25). Com isso, temos o seguinte balanço para os sólidos totais secos:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \left(-Y_{W/O_2} \cdot MH_2O - Y_{CO_2/O_2} \cdot MCO_2 + MO_2 \right) \frac{\partial O_2}{\partial t} \quad (29)$$

Onde o primeiro termo do lado direito está relacionado com a conversão de massa seca em água durante metabolismo oxidativo, o segundo termo está relacionado com a perda de massa na forma de CO_2 e o terceiro termo está relacionado com o ganho de massa na forma da incorporação de O_2 .

Então, através da Eq. (29) é possível estimar a variação da concentração de sólidos secos durante o processo de cultivo. Os valores dos fatores de conversão Y_{W/O_2} e Y_{CO_2/O_2} podem variar durante o processo, mas um valor médio pode ser utilizado de acordo com a literatura.

4.3.5. Atividade de Água para a Fase Sólida

Ao se expor um substrato a uma determinada umidade relativa, ocorre o fenômeno de transferência de massa para se alcançar um equilíbrio dinâmico entre a umidade do substrato e a do ambiente. Tal fato acontece quando a pressão de vapor da água na superfície do material se iguala à do ar que o envolve.

O estudo da relação entre a umidade do substrato e a sua atividade de água pode ser feito através das isotermas de sorção. Uma isoterma é uma curva que descreve a relação de equilíbrio entre o teor total de umidade de um substrato e a pressão de vapor ou umidade relativa, a uma dada temperatura. Essa relação depende de diversos fatores, tais como da estrutura física da superfície do material, composição química e afinidade com a água. Portanto, como cada substrato apresenta características distintas de sorção de umidade, faz-se necessária a determinação experimental das isotermas para cada tipo de substrato.

Uma equação empírica é utilizada para descrever a isoterma conforme a Eq. (30) (CALÇADA, 1998):

$$\varphi_s^* = \left[\frac{\ln(1 - a_{wg}^{C_5})}{-\exp(C_1 + C_2 \cdot T_g)} \right]^{\frac{1}{(C_3 + C_4 \cdot T_g)}} \quad (30)$$

onde,

φ_s^* = água contida na fase sólida quando em equilíbrio com a fase gasosa (kg-água . kg-substrato-seco⁻¹);

a_{wg} = atividade de água da fase gasosa;

T_g = temperatura da fase gasosa (°C);

C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 = constantes que serão determinadas através dos experimentos por regressão multivariável.

Para determinação das constantes C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 utilizou-se uma sub-rotina de regressão multivariável através do software TKSolver (Universal Technical Systems – UTS). Desta forma utilizou-se os valores das constantes considerando o melhor ajuste da Eq. (30) em

relação aos dados experimentais obtidos de conteúdo de umidade em relação a atividade de água para todas as temperaturas em que foram determinadas as isotermas.

A atividade de água para a fase sólida é então derivada da isoterma para o substrato (Eq. (29)) rearranjada da seguinte para isolar a_w :

$$a_w(t, z) = a_{ws}(t, z) = \left\{ 1 - \exp \left[-\varphi_s(t, z)^{(C_3 + C_4 \cdot T_{f4}(t, z))} \cdot \exp(C_1 + C_2 \cdot T_{f4}(t, z)) \right] \right\}^{\left(\frac{1}{C_5} \right)} \quad (31)$$

$$a_w(i+1, j) = a_{ws}(i+1, j) = \left\{ 1 - \exp \left[-\varphi_s(i+1, j)^{(C_3 + C_4 \cdot T_{f4}(i+1, j))} \cdot \exp(C_1 + C_2 \cdot T_{f4}(i+1, j)) \right] \right\}^{\left(\frac{1}{C_5} \right)}$$

4.3.6. Atividade de Água para a Fase Gasosa

A atividade de água da fase gasosa, a qual é proporcional a umidade relativa (UR/100), é dada pela pressão de vapor da água dividida pela pressão de vapor de saturação em uma determinada temperatura:

$$a_w(t, z) = a_{wg}(t, z) = \frac{\varphi_g(t, z) \cdot P}{P_w^{sat}(\varphi_g(t, z) + 0,62413)} \quad (32)$$

Isolando o conteúdo de umidade da fase gasosa φ_g temos:

$$\varphi_g(t, z) = \frac{a_w(t, z) \cdot P_w^{sat} \cdot 0,62413}{P - a_w(t, z) \cdot P_w^{sat}} \quad (33)$$

$$\varphi_g(i+1, j) = \frac{a_w(i+1, j) \cdot P_w^{sat} \cdot 0,62413}{P - a_w(i+1, j) \cdot P_w^{sat}}$$

onde,

P_w^{sat} = pressão parcial de saturação da fase gasosa (Pa).

A pressão de saturação parcial é derivada da equação de Antoine (REID et al., 1977)

$$P_w^{sat} = 133,322 \cdot e^{\left(18,3036 - \frac{3816,44}{(T_{f4}(t, z) + 227,02)} \right)} \quad (34)$$

T_{f4} = temperatura filtrada obtida do quarto filtro (equilíbrio entre a fase sólida e gasosa (°C)).

Como a atividade de água entre a fase gasosa e a fase sólida está em equilíbrio, $a_{ws}(t,z)=a_{wg}(t,z)=a_w(t,z)$, e determinando a atividade água inicial da fase sólida através da Eq. (31), pode-se estimar a umidade da fase gasosa (φ_g).

4.3.7. Balanço de Água Global

Considerando o equilíbrio da atividade de água entre as duas fases onde $a_{ws}(t,z)=a_{wg}(t,z)=a_w(t,z)$, temos o seguinte balanço de água global:

$$\varepsilon \cdot \rho_g \frac{\partial \varphi_g}{\partial t} - G \frac{\partial \varphi_g}{\partial z} = - \frac{\partial (S \cdot \varphi_s)}{\partial t} + \frac{\partial W}{\partial t} \quad (35)$$

ε = porosidade (m^3 -espaço-vazio . m^{-3});

ρ_g = densidade da fase gasosa ($\text{kg-ar-seco} \cdot \text{m}^{-3}$);

G = fluxo mássico de ar ($\text{kg-ar.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$);

φ_g = conteúdo de umidade da fase gasosa ($\text{kg-água} \cdot \text{kg-ar-seco}^{-1}$);

S = massa de substrato contido no leito ($\text{kg - subst. - seco} \cdot \text{m}^{-3}$);

φ_s = umidade da fase sólida ($\text{kg - água} \cdot \text{kg - subst. - seco}^{-1}$);

W = água produzida pelo metabolismo ($\text{kg - água} \cdot \text{m}^{-3}$).

Com isso o primeiro termo da Eq. (35) do lado esquerdo representa a variação de umidade da fase gasosa e o segundo termo é o termo que se refere à variação da umidade da fase gasosa nas diferentes posições no eixo vertical devido à convecção. O primeiro termo do lado direito representa a variação da umidade da fase sólida em relação à variação dos sólidos secos e o segundo termo é referente à água produzida pelo metabolismo do microrganismo.

Aplicando diferenças finitas para frente na Eq. (35), temos:

$$\begin{aligned}
 & \varepsilon \cdot \rho_g \frac{(\varphi_g(i+1, j) - \varphi_g(i, j))}{\Delta t} - G \frac{(\varphi_g(i, j) - \varphi_g(i, j-1))}{\Delta z} = \\
 & - \left[\frac{(S(i+1, j) - S(i, j))}{\Delta t} \cdot \varphi_s(i, j) + \frac{(\varphi_s(i+1, j) - \varphi_s(i, j))}{\Delta t} S(i, j) \right] + \frac{\partial W}{\partial t} \\
 & R1 = \varepsilon \cdot \rho_g \frac{(\varphi_g(i+1, j) - \varphi_g(i, j))}{\Delta t} - G \frac{(\varphi_g(i, j) - \varphi_g(i, j-1))}{\Delta z} \\
 & R2 = - \left[\frac{(S(i+1, j) - S(i, j))}{\Delta t} \cdot \varphi_s(i+1, j) + \frac{(\varphi_s(i, j) - \varphi_s(i-1, j))}{\Delta t} S(i+1, j) \right] + \frac{\partial W}{\partial t}
 \end{aligned} \tag{36}$$

Tendo os valores experimentais iniciais de umidade da fase sólida ($\varphi_s(i, j)$), conseguiu-se determinar a atividade de água ($a_w(i, j)$) através da Eq. (31). Como se considerou o equilíbrio entre as duas fases do sistema em relação à atividade água e temperatura, a partir da atividade água calculada através da Eq. (31) pode-se calcular a umidade da fase gasosa ($\varphi_g(i, j)$). Com esses valores, estimou-se um valor para a umidade da fase sólida para um tempo $i+1$ ($\varphi_s(i+1, j)$) e assim estimou-se também a umidade para a fase gasosa para um tempo posterior, $i+1$, ($\varphi_g(i+1, j)$). Para que esses valores estimados de umidade fossem válidos, foi utilizado o método da bissecção para determinação simultânea de $\varphi_s(i+1, j)$ e $\varphi_g(i+1, j)$, onde os valores estimados deveriam satisfazer a igualdade $R1 = R2$, sendo determinado um erro aceitável para $|R1 - R2| < 10^{-5}$.

4.2.8. Sistema de Equações

Para a resolução das equações utilizou-se o método de diferenças finitas para frente para estimar as variáveis no tempo, sendo implementado um programa na linguagem de programação Fortran (Compaq Visual Fortran 6.0), (ANEXO II), para resolução do sistema a partir das temperaturas filtradas obtidas durante os cultivos. O sistema de equações é composto por nove equações com nove variáveis:

- Cálculo do calor metabólico produzido pelo microrganismo

$$Q(i+1, j) = \left[-\varepsilon \cdot \rho_g \alpha \frac{(T_{f4}(i+1, j) - T_{f4}(i, j))}{\Delta t} + \alpha \cdot G \frac{(T_{f4}(i, j) - T_{f4}(i, j-1))}{\Delta z} + \right. \\ \left. + S \cdot \beta \cdot \frac{(T_{f4}(i+1, j) - T_{f4}(i, j))}{\Delta t} + \lambda \frac{\partial H_{sat}}{\partial T} \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \cdot G \right] \Delta t + Q(i, j)$$

- Cálculo da umidade de saturação

$$\frac{\partial H_{sat}}{\partial T} = \frac{0,62413 \cdot 3816,44 \cdot P}{(T_{f4}(i, j) + 227,02)^2 \cdot \left(\frac{P}{133,322 \cdot e^{\left(\frac{18,3036}{(T_{f4}(i, j) + 273,15) - 46,13} \right) - 1}} - 1 \right)^2 \cdot 133,322 \cdot e^{\left(\frac{18,3036}{(T_{f4}(i, j) + 273,15) - 46,13} \right)}}$$

- Cálculo do oxigênio consumido pelo microrganismo

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = \frac{1}{Y_{O_2/O_2}} \cdot \frac{\partial Q}{\partial t}$$

- Cálculo do gás carbônico produzido pelo microrganismo

$$\frac{\partial CO_2}{\partial t} = -Y_{CO_2/O_2} \cdot \frac{\partial O_2}{\partial t} \cdot MCO_2$$

- Cálculo da água metabólica produzida

$$\frac{\partial W}{\partial t} = -Y_{W/O_2} \cdot \frac{\partial O_2}{\partial t} \cdot MH_2O$$

- Balanço dos sólidos secos

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \left(-Y_{W/O_2} \cdot MH_2O - Y_{CO_2/O_2} \cdot MCO_2 + MO_2 \right) \cdot \frac{\partial O_2}{\partial t}$$

- Cálculo da umidade da fase sólida

$$\varepsilon \cdot \rho_g \frac{(\varphi_g(i+1, j) - \varphi_g(i, j))}{\Delta t} - G \frac{(\varphi_g(i, j) - \varphi_g(i, j-1))}{\Delta z} = - \left[\frac{(S(i+1, j) - S(i, j))}{\Delta t} \cdot \varphi_s(i, j) + \frac{(\varphi_s(i+1, j) - \varphi_s(i, j))}{\Delta t} S(t, z) \right] + \frac{\partial W}{\partial t}$$

Para estimar a umidade do leito ($\varphi_s(i+1, j)$), foi aplicado o método da bissecção para satisfazer a igualdade da equação, conforme demonstrado na seção 4.3.7.

- Cálculo da atividade água

$$a_w(t, z) = a_{ws}(t, z) = \left\{ 1 - \exp \left[- \varphi_s(t, z)^{(C_3 + C_4 \cdot T_{f4}(t, z))} \cdot \exp(C_1 + C_2 \cdot T_{f4}(t, z)) \right] \right\}^{\left(\frac{1}{C_5} \right)}$$

- Cálculo da umidade da fase gasosa

$$\varphi_g(t, z) = \frac{a_w(t, z) \cdot P_w^{sat} \cdot 0,62413}{P - a_w(t, z) \cdot P_w^{sat}}$$

4.2.9. Condições Iniciais

No tempo inicial ($t = 0$) a concentração volumétrica do sólido (S_0), conteúdo de umidade do ar (φ_{g0}), conteúdo de umidade do sólido (φ_{s0}), temperatura do ar (T_{g0}) e temperatura do sólido (T_{s0}) são estabelecidos na preparação do substrato inoculado e operação do biorreator, sendo que cada parâmetro possui os mesmos valores iniciais em toda altura do leito.

$$\varphi_g = \varphi_{g0};$$

$$\varphi_s = \varphi_{s0};$$

$$T_g = T_{g0};$$

$$T_s = T_{s0};$$

$$S = S_0 = \left(\frac{1}{1 + \varphi_{s0}} \right) \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_{su} \quad (37)$$

onde

ρ_{su} = densidade do substrato úmido (kg-substrato-úmido . m⁻³)

4.2.10. Condições de Contorno

No fundo do biorreator, a temperatura e umidade do ar são mantidas nos valores que possuíam no tempo inicial:

$$Z=0$$

$$\varphi_g = \varphi_{gi} = \varphi_{g0}$$

$$T_g = T_{gi} = T_{g0}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da Produção de Esporos

Para cada ensaio, com o objetivo da produção de inóculo para o biorreator, seguiu-se o procedimento descrito na seção 3.3., onde se obteve 300 mL de suspensão de esporos a partir de cada grupo estudado. A partir da média do número de esporos obtidos em cada grupo, considerou-se 16 quadrados da Câmara de Neubauer e um fator de diluição de 300, referente ao volume da suspensão de esporos. Com isso, aplicando a Eq. (1), foi obtida a concentração média de esporos para cada grupo, conforme demonstrado na TABELA 3.

TABELA 3. Concentração de esporos nas suspensões A, B e C.

Grupos	Concentração (esporos . mL ⁻¹)
A	1,97.10 ⁸
B	1,31.10 ⁸
C	6,50.10 ⁷

De acordo com os resultados apresentados, a melhor condição foi o cultivo com 60% de umidade. Se considerarmos uma inoculação de 10⁶ esporos . g-subst.-úmido⁻¹ no biorreator, para uma massa média de 100-120 kg de substrato úmido utilizados durante a fermentação, necessitamos de aproximadamente 5,0 – 6,0 L de suspensão de esporos produzida a partir do cultivo do fungo em arroz com 60% de umidade.

Ainda para padronizar o trabalho, seria interessante repetir este procedimento e substituir o método de raspagem manual da biomassa para extração dos esporos, pois dependendo da forma e operador que realiza esta tarefa pode influenciar os resultados finais. Para isso, pode-se utilizar outra técnica como a trituração da massa de arroz e biomassa em liquidificador para posterior adição de água. Desta forma é possível colocar a mistura sob agitação contínua durante um período pré-determinado e após sua secagem o pó obtido poderia ser utilizado como inóculo no biorreator. Outra possibilidade seria utilizar a massa triturada, com a adição de água, como inóculo para o biorreator.

Entretanto, existe a vantagem da utilização de uma suspensão de esporos ao invés de pó, pois a inoculação da suspensão de esporos no processo pode ser realizada facilmente através de pulverização sobre o substrato para que haja uma melhor homogeneização a massa, sendo que haveria dificuldade para se proceder da mesma forma utilizando o pó como inóculo, além de ser necessário tomar medidas preventivas para os esporos não contaminem o ambiente.

5.2. Isotermas dos Substratos em Diferentes Temperaturas

A determinação da isoterma da soja cozida e do trigo moído cozido é uma etapa importante devido à necessidade da determinação dessa propriedade dos dois substratos que será aplicada nos estudos de modelagem do processo.

Para isso, determinaram-se experimentalmente as isotermas em diferentes temperaturas conforme descrito na seção 3.6. Com os dados experimentais obtidos, utilizou-se o software TKsolver e a subrotina MARQFITN.TK que permitiu o ajuste da equação da isoterma de Calçada (1998) (Eq. (30)) para N variáveis independentes. Desta forma os resultados experimentais de umidade (ϕ_s), atividade de água (a_{ws}) e temperatura (T) foram inseridos em local apropriado. A equação da isoterma foi também inserida no módulo apropriado para determinação do melhor ajuste da isoterma e dos parâmetros C1, C2, C3, C4 e C5.

5.2.1. Isoterma da Soja em Diferentes Temperaturas

Durante o experimento realizado na temperatura de 35 °C, houve o crescimento de contaminantes que acabaram influenciando nos resultados. Assim, para evitar este problema, todos os experimentos foram realizados conforme descrito na seção 3.6. onde se utilizou uma solução, para hidratar o substrato, acidificada com ácido lático para diminuir o risco de contaminação e também, todos os materiais foram autoclavados durante 15 min a 121 °C.

A determinação da umidade foi realizada semanalmente até a estabilização da massa das amostras de substrato, ou seja, até que se atingisse um equilíbrio entre a fase gasosa e a fase líquida para uma determinada temperatura e atividade água.

Na FIGURA 30 está demonstrada a média dos resultados das triplicatas obtidas de umidade em relação à atividade de água em cada temperatura. Com os dados experimentais foi ajustada a equação da isoterma, sendo os valores das constantes mostrados na TABELA 4.

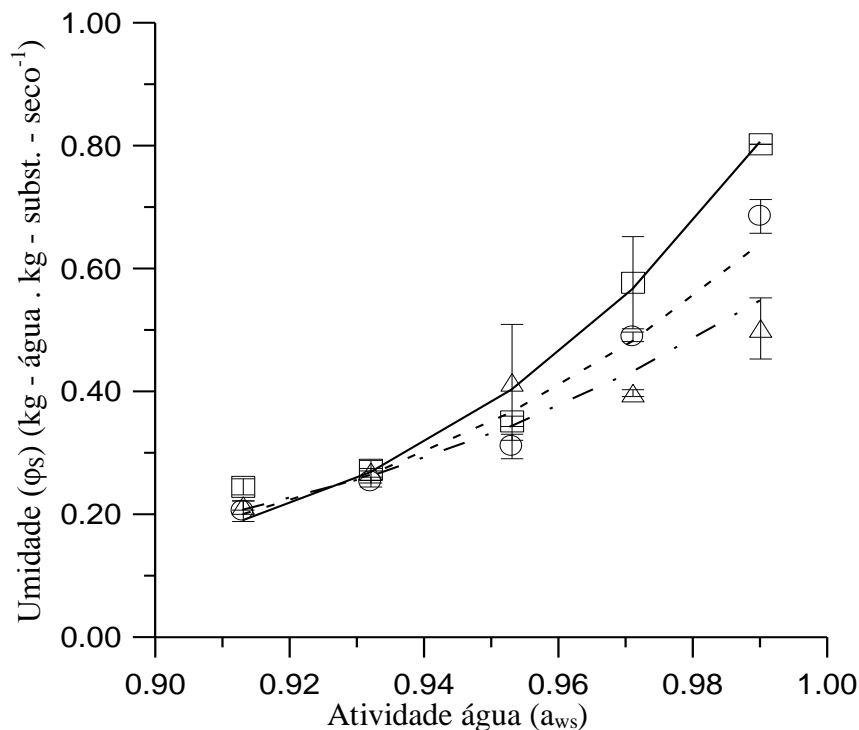


FIGURA 30. Isotherma da soja em diferentes temperaturas. (\square) umidade a 35 °C, (—) modelo a 35°C, (\circ) umidade a 45 °C, (- - -) modelo a 45 °C, (Δ) umidade a 55 °C, (— - —) modelo a 55 °C.

Com o ajuste obtido da equação da isoterma de Calçada (1998) em relação aos dados experimentais para a isoterma da soja em diferentes temperaturas, foi possível obter um conjunto de valores dos parâmetros, através do software TKsolver, demonstrado abaixo na TABELA 4:

TABELA 4. Valores das constantes da equação da isoterma para soja (Eq. (30), seção 4.8).

Constantes	Valores
C1	-26,072
C2	0,766
C3	3,351
C4	0,549
C5	410,894

Também foi determinado um erro estimado para o ajuste da isoterma utilizando este conjunto de valores em relação aos valores de atividade água do experimento, no eixo y, temos que $dy = 0,019$.

5.2.2. Isotherma do Trigo em Diferentes Temperaturas

Da mesma forma que a soja, o mesmo procedimento para determinação da isoterma foi feito para o trigo moído. Nesta etapa, também foram tomados os devidos cuidados quanto esterilização dos materiais para que não houvesse crescimento de contaminantes que interferem nos resultados.

Após equilíbrio das atividades de água da fase sólida em relação à fase gasosa, os resultados experimentais foram utilizados para ajustar a equação da isoterma, conforme demonstrado na FIGURA 31.

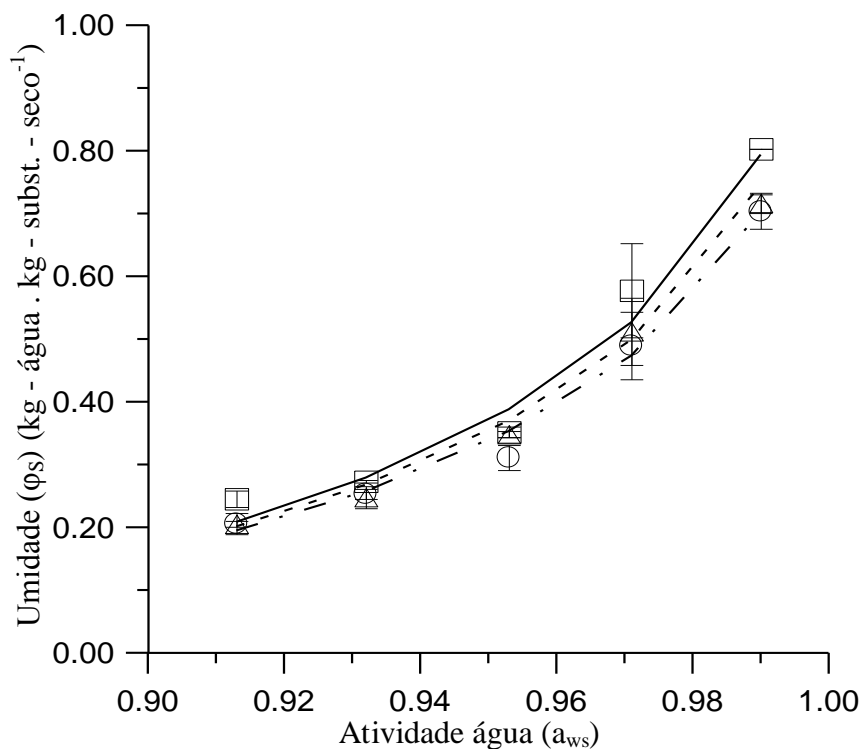


FIGURA 31. Isotherma do trigo moído em diferentes temperaturas. (□) umidade a 35 °C, (—) modelo a 35°C, (○) umidade a 45 °C, (- - -) modelo a 45 °C, (Δ) umidade a 55 °C, (— - —) modelo a 55 °C.

Da mesma forma, foi possível obter um conjunto de valores dos parâmetros para um melhor ajuste da equação da isoterma de Calçada (1998), que estão demonstrados na TABELA 5:

TABELA 5. Valores das constantes da equação da isoterma para o trigo moído (Eq. (30), seção 4.8).

Constantes	Valores
C1	0,245
C2	0,016
C3	2,129
C4	0,005
C5	31,163

Neste ajuste, o erro estimado na predição em relação aos valores de atividade água do experimento, no eixo y, é $dy = \pm 0,013$.

5.3. Calor Específico do Substrato

Os resultados obtidos durante o experimento para determinação do calor específico dos substratos, a partir do procedimento descrito na seção 3.7, foi realizado tanto para soja descascada bipartida quanto para o trigo moído em diferentes umidades. Os resultados obtidos para a soja bipartida estão apresentados na TABELA 6, sendo realizadas 12 medidas de calor específico:

TABELA 6. Calor específico para a soja.

Umidade (ϕ_s) (g água.g subst. seco ⁻¹)	c_{ps} úmido soja úmida (J . kg ⁻¹ . °C ⁻¹)	c_{ps} soja seca (J . kg ⁻¹ . °C ⁻¹)*
0,50	3501,73	3162,59
0,50	3196,03	2704,04
0,50	3261,90	2802,86
0,72	3204,06	2503,30
0,72	3071,86	2276,19
0,72	3038,76	2219,32
0,75	3082,84	2258,85
0,75	3181,77	2432,07
0,75	3305,71	2649,10
1,27	3151,47	1845,24
1,27	3136,55	1811,37
1,27	3253,35	2076,51
	MÉDIA	2311,78

* calculada a partir da Eq. (5), seção 3.7

A literatura faz referência a valores para o calor específico da soja inteira variando de 2048,2 – 2215,4 J . kg⁻¹ . °C⁻¹ (BROOKER, 1974; CELESTINO, 1998). Com isso, considerando os erros experimentais, foi utilizada uma média para o calor específico da soja com $c_{ps}= 2311,78$ J . kg⁻¹ . °C⁻¹ como parâmetro de entrada para o modelo matemático.

Da mesma forma, foi executado o mesmo experimento para determinação do calor específico para o trigo moído, conforme mostrado na TABELA 7, sendo neste caso realizadas 9 medidas:

TABELA 7. Calor específico para o trigo moído.

<i>Umidade (φ_s) (g água.g subst. seco⁻¹)</i>	<i>$c_{psúmido}$ do trigo úmido (J . kg⁻¹ . °C⁻¹)</i>	<i>c_{ps} do trigo seco (J . kg⁻¹ . °C⁻¹)*</i>
0,53	3639,36	3348,84
0,53	3640,11	3352,80
0,53	3733,13	3486,99
1,13	4006,78	3812,79
1,13	3994,15	3778,33
1,13	3882,39	3530,10
2,06	4157,36	4110,79
2,06	4144,88	4073,09
2,06	3895,26	3296,10
	MÉDIA	3643,31

* calculada a partir da Eq. (5), seção 3.7

Neste caso, a literatura faz referência para valores de calor específico de grãos de trigo inteiro variando de 1410 – 1590 J . kg⁻¹ . °C⁻¹ (RIBEIRO, 2007) e a média para o calor específico do trigo moído determinado a partir do experimento foi $c_{ps}= 3.643,31$ J . kg⁻¹ . °C⁻¹. Entretanto, considerando que não ocorre diferenças significativas na mudança dessa propriedade em relação ao formato e tamanho, por ser uma propriedade física intrínseca da matéria, o valor utilizado como parâmetro de entrada para o modelo foi $c_{ps}= 1590$ J . kg⁻¹ . °C⁻¹.

Os erros gerados nesse experimento não permitiram a determinação precisa dos calores específicos dos substratos secos (c_{ps}). Esses erros provavelmente decorreram devido a troca de calor com as vizinhanças, fenômeno que não é levado em conta nas equações utilizadas, já que foi considerado que o calorímetro é perfeitamente isolado do meio. Esse erro poderia ser

reduzido com a utilização de um calorímetro com um isolamento mais adequado e com um número maior de resultados.

5.4. Determinação das Densidades dos Substratos

A determinação da densidade para cada substrato, tanto para a soja como para o trigo moído, foi realizada seguindo o procedimento descrito na seção 3.8. Os resultados estão apresentados na TABELA 8, sendo os valores uma média dos experimentos realizados em triplicata a temperatura de 20-25 °C.

TABELA 8. Densidades calculadas para a soja bipartida e para o trigo moído.

<i>Substrato</i>	<i>Densidade (g.cm⁻³)</i>	<i>Umidade de saturação (20- 25°C)</i> <i>(g-água . g-subst.-seco⁻¹)</i>
Soja bipartida	1,15	1,26
Trigo moído	1,06	2,50

Os experimentos para determinação da densidade dos substratos foram realizados com o substrato saturado de água. Isso foi necessário, pois durante o experimento, uma certa massa de substrato era submersa em água dentro de uma proveta para que fosse determinado seu volume. Desta forma, o substrato não poderia mudar sua composição com a absorção de mais água, que pode alterar tanto o seu volume, massa e conseqüentemente sua densidade.

Para os experimentos realizados no biorreator foram utilizadas diferentes umidades para cada substrato, sendo utilizados de 0,9 – 1,4 g-água.g-subst.seco-1, mas considerou-se os valores de densidade para o substrato com umidade saturada no modelo matemático. O uso de teores de umidade abaixo da umidade de saturação de cada substrato foi para que não houvesse água em excesso durante o cultivo do fungo o qual poderia favorecer o crescimento de contaminantes. Nos experimentos com trigo moído utilizou-se umidades entre 1,0 – 1,3 g-água . g-subst.-seco-1 para que não houvesse uma gelatinização do amido o que resultaria em um leito com massa compacta que não permitiria a passagem do fluxo de ar através do leito.

Uma alternativa seria o uso de outro solvente, neste caso poderia ser um solvente hidrofóbico que permita a determinação do volume de uma massa conhecida de substrato, com diferentes

teores de umidade, e que não seja absorvido pelo substrato ou altere a composição do mesmo. Desta forma, seria possível determinar uma densidade em relação ao teor de umidade de cada substrato, permitindo utilizar valores de densidade mais próximos da realidade no modelo de inferência.

5.5. Resultados dos Experimentos Realizados no Biorreator

Foram realizados quatro experimentos no biorreator de escala piloto, que consistiram no cultivo do fungo *Rhizopus oryzae* em soja bipartida ou em trigo moído. Cada experimento teve a finalidade de obter dados experimentais de temperatura e umidade do leito durante o processo para validar o modelo matemático que utiliza o método *soft-sense*.

Além disso, em cada experimento foi sendo otimizada a operação dos equipamentos para se obter dados mais confiáveis, facilitar o trabalho e até mesmo para elaboração dos procedimentos operacionais padrão.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos em cada experimento e também os resultados obtidos com o modelo matemático.

5.5.1. Cultivo do Fungo *R. oryzae* em Soja

5.5.1.1. Experimento 1

Para a realização do experimento 1, foi utilizada a soja imersa em excesso de água durante um período de 12 horas (*overnight*). As condições operacionais utilizadas no experimento são demonstradas na TABELA 9, que também foram utilizados como valores de entrada para o modelo matemático. Com isso, os resultados de predição da umidade do leito foram comparados com os dados experimentais. Neste experimento foram somente coletadas amostras superficiais do leito, em triplicata, para determinação da umidade.

TABELA 9. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 1 com soja.

Variáveis	Valores	
Fluxo do Ar de Entrada (G)	267,28 kg de ar seco . s ⁻¹ . m ⁻²	Determinado
Pressão da Fase Gasosa (P)	101325 Pa	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Gás Seco (c _{pg})	1005 J . kg de ar seco ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Vapor de Água (c _{pv})	1791 J . kg de vapor água ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Sólido Seco (c _{ps})	2311,78 J . kg de sólido seco ⁻¹ . K ⁻¹	SWEAT (1986)
Capacidade Calorífica da Água Líquida (c _{pw})	4184 J . kg de água líquida ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Densidade da Fase Gasosa (ρ _g)	0,964 kg de ar seco . m ⁻³	HIMMELBLAU (1996)
Densidade do Substrato Úmido (ρ _{su})	1150 kg de subst. úmido . m de subst.umido ⁻³	Determinado
	0,4 m ³ de espaço vazio . m de leito ⁻³	Determinado
Fração de espaço vazio (ε)		
C1, C2, C3, C4, C5	-26,072; 0,766; 3,351; 0,549; 410,894	Determinado CALÇADA (1998)
Entalpia de Vaporização da Água (λ)	2414300 J . kg de água ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Umidade Inicial do Substrato (φ _{so})	1,26 kg de água . kg de sólido seco ⁻¹	Determinado
Coeficiente de rendimento de calor em função ao consumo de oxigênio (Y _{Q/O₂})	5,19.10 ⁵ J . mol ⁻¹ de O ₂	(BAILEY e OLLIS, 1986)
Coeficiente de rendimento de água em função ao consumo de oxigênio (Y _{W/O₂})	1,2 mol de H ₂ O . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Coeficiente de rendimento de gás carbônico em função ao consumo de oxigênio (Y _{CO₂/O₂})	1 mol de CO ₂ . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Massa molar da Água (MH ₂ O)	0,018 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do CO ₂ (MCO ₂)	0,044 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do O ₂ (MO ₂)	0,032 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do Ar (MAr)	0,029 kg . mol ⁻¹	

Os dados de temperatura foram monitorados a partir do *software* desenvolvido em Labview. Com isso, os valores de temperatura foram filtrados (FIGURA 32) pelo modelo matemático e utilizados como valores de entrada para o modelo de inferência.

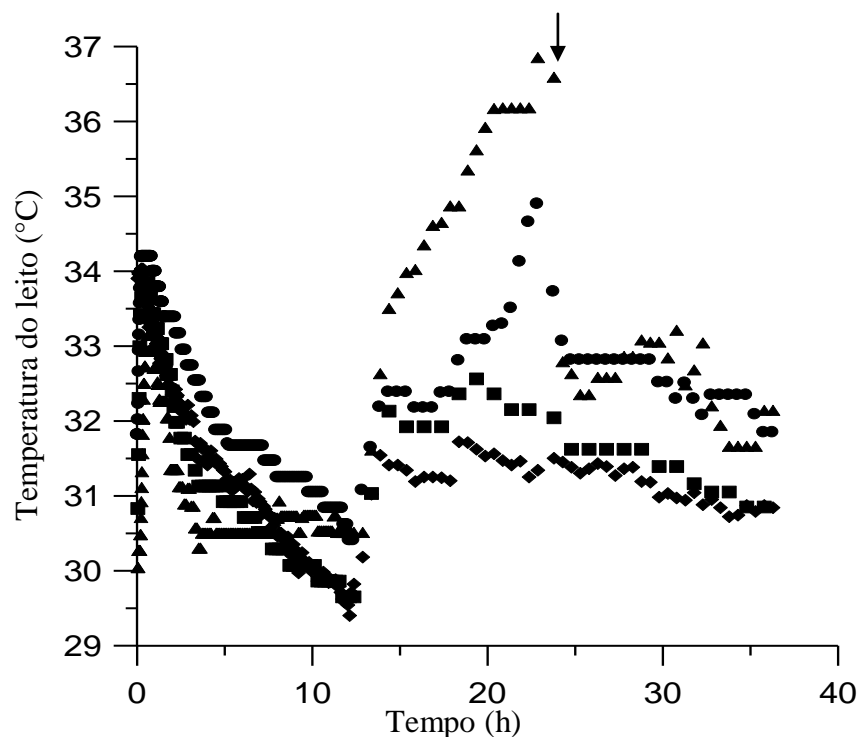


FIGURA 32. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.

Durante o experimento foram utilizados 60 kg de soja seca, obtendo uma massa total após a absorção de água de aproximadamente 135 kg, que forneceu um leito com altura de 35 cm, necessária para cobrir pelo menos os três primeiros termopares. Com isso, as temperaturas obtidas pelos termopares nas diferentes alturas do leito (FIGURA 32) mostram que houve crescimento do microrganismo devido ao aumento de temperatura promovido pela liberação de calor metabólico e restrição de resfriamento do sistema o que ocasionou também a formação de gradientes de temperatura no sentido do fluxo do ar através do leito.

Com o aumento de temperatura, que é um fator limitante para o crescimento do microrganismo, o biorreator foi agitado após 24 horas de cultivo, indicado por uma seta no gráfico, onde a temperatura no topo do leito já chegava a valores próximos de 37 °C. Houve também uma compactação do leito durante o experimento, o que formou caminhos preferenciais de fluxo de ar próximos à parede do biorreator e acabou prejudicando a remoção de calor no interior do leito. Essa compactação pode ter ocorrido devido à secagem do leito ou até mesmo devido ao crescimento do microrganismo, onde suas hifas fazem com que aumente

a resistência ao fluxo do ar no interior do leito e força o ar a passar próximo às paredes ou por regiões onde existe uma menor resistência.

Assim, como uma forma de homogeneizar a temperatura do leito e descompactá-lo, o tambor do biorreator foi agitado durante 15 min até que houvesse uma completa descompactação do leito. Após agitação a temperatura do leito voltou para torno de 32 a 33 °C, sendo está uma temperatura ótima para crescimento do fungo *R. oryzae* (DALSENTER, 2005).

Além da temperatura, também foram monitoradas as umidades no topo do leito para que os dados experimentais fossem confrontados com as previsões do modelo matemático. As umidades tanto do experimento como as previstas pelo modelo são mostradas na FIGURA 33.

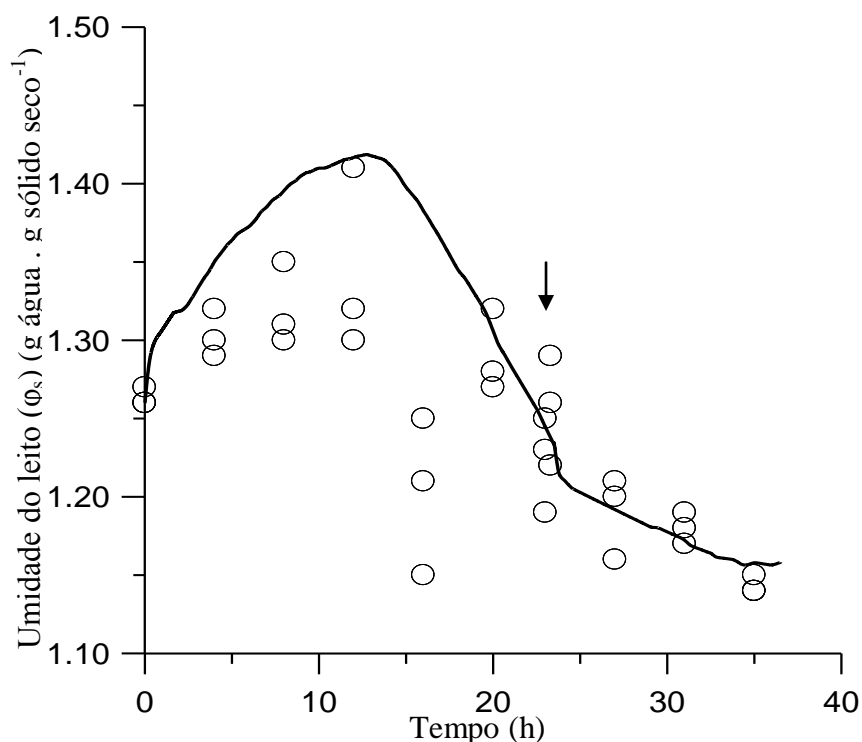


FIGURA 33. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (○) umidade a 33 cm em triplicata, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. R = 0,86.

A umidade do leito aumenta no início do experimento nas primeiras 10 horas devido ao resfriamento do leito, o que acaba provocando a condensação de água no leito e assim aumenta sua umidade. Com o aquecimento do leito após 12 horas de experimento percebe-se uma diminuição de sua umidade provocada pela remoção de calor através da evaporação da água.

A previsão do modelo considera que ocorre um aumento de grandeza maior do que aquele observado experimentalmente com a umidade do leito alcançando um valor máximo para o topo do leito de 1,42 g-água.g-substrato-seco-1 sendo o valor médio obtido experimentalmente de 1,34 g de água . g substrato seco-1. Com isso, o coeficiente de correlação de Pearson (R), entre a previsão do modelo em relação a média dos valores obtidos experimentalmente foi $R = 0,86$.

Após 12 horas da agitação não se notou a retomada do crescimento do fungo que pode ser observada pelo aumento da temperatura do leito, sendo que neste caso o leito ainda teve uma ligeira queda de temperatura até o final do experimento. Isso pode ser devido ao efeito das tensões de cisalhamento que podem ter danificado as hifas do fungo e prejudicado seu crescimento, principalmente para o fungo *R. oryzae* utilizado que não possui hifas septadas.

Além disso, acabaram prevalecendo outros microrganismos presentes no leito, como leveduras e bactérias, que não sofreram com a agitação. Esses microrganismos tiveram um crescimento lento, o que não ocasionou a formação de gradientes de temperatura devido à liberação de calor metabólico e também produziu odores desagradáveis no restante do experimento, sendo o experimento interrompido às 36 horas de cultivo.

5.5.1.2. Experimento 2

Para o experimento 2, foi utilizado 70 kg de soja bipartida, sendo adicionado 0,75 kg de água . kg de substrato seco⁻¹. Nas primeiras 4 horas, a cada hora a mistura do substrato mais água foi agitada para garantir uma absorção homogênea da água pelo substrato e depois a mistura foi deixada em repouso durante um período de 12 horas (*overnight*).

Neste experimento foram coletadas amostras em diferentes alturas do leito conforme descrito na seção 3.11.4.3., em duplicata, para determinação da umidade. Para este experimento e para o modelo matemático foram utilizadas as seguintes condições operacionais, demonstradas na TABELA 10:

TABELA 10. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 2 com soja.

Variáveis	Valores	
Fluxo do Ar de Entrada (G)	267,28 kg de ar seco . s ⁻¹ . m ⁻²	Determinado
Pressão da Fase Gasosa (P)	101325 Pa	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Gás Seco (c _{pg})	1005 J . kg de ar seco ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Vapor de Água (c _{pv})	1791 J . kg de vapor água ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Sólido Seco (c _{ps})	2311,78 J . kg de sólido seco ⁻¹ . K ⁻¹	SWEAT (1986)
Capacidade Calorífica da Água Líquida (c _{pw})	4184 J . kg de água líquida ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Densidade da Fase Gasosa (ρ _g)	0,964 kg de ar seco . m ⁻³	HIMMELBLAU (1996)
Densidade do Substrato Úmido (ρ _{su})	1150 kg de subst. úmido . m de subst.úmido ⁻³	Determinado
Fração de espaço vazio (ε)	0,4 m ³ de espaço vazio . m de leito ⁻³	Determinado
C1, C2, C3, C4, C5	-26,072; 0,766; 3,351; 0,549; 410,894.	Determinado CALÇADA (1998)
Entalpia de Vaporização da Água (λ)	2414300 J . kg de água ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Umidade Inicial do Substrato (φ _{so})	0,90 kg de água . kg de sólido seco ⁻¹	Determinado
Coeficiente de rendimento de calor em função ao consumo de oxigênio (Y _{Q/O₂})	5,19.10 ⁵ J . mol ⁻¹ de O ₂	(BAILEY e OLLIS, 1986)
Coeficiente de rendimento de água em função ao consumo de oxigênio (Y _{W/O₂})	1,2 mol de H ₂ O . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Coeficiente de rendimento de gás carbônico em função ao consumo de oxigênio (Y _{CO₂/O₂})	1 mol de CO ₂ . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Massa molar da Água (MH ₂ O)	0,018 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do CO ₂ (MCO ₂)	0,044 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do O ₂ (MO ₂)	0,032 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do Ar (MAr)	0,029 kg . mol ⁻¹	

Os resultados de temperatura monitorados a partir do *software* desenvolvido em Labview foram então filtrados pelo modelo matemático, sendo mostrados na FIGURA 34.

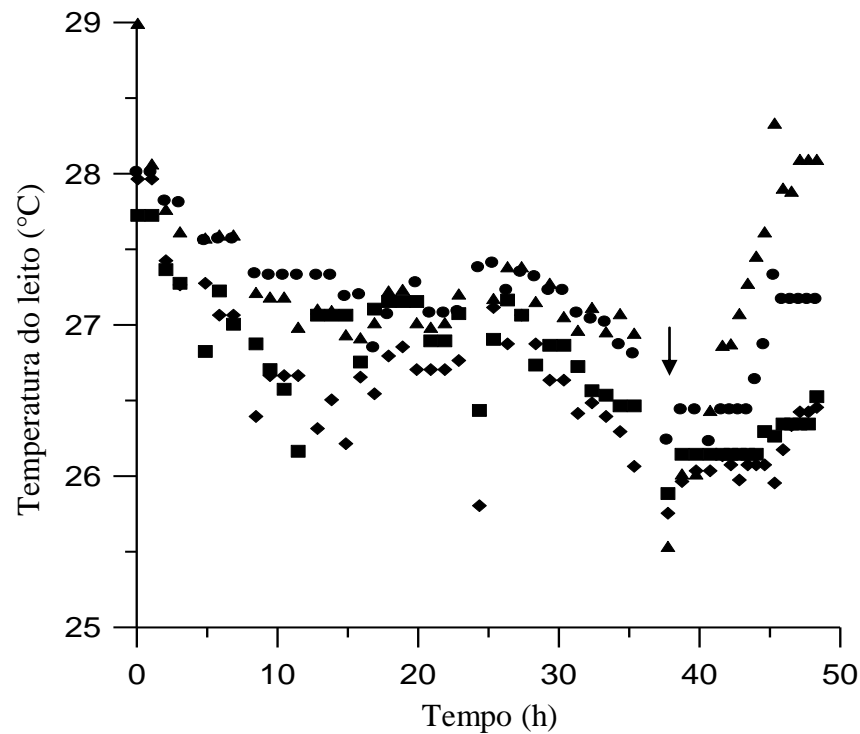


FIGURA 34. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.

As temperaturas do leito, obtidas pelos termopares nas diferentes alturas do leito (FIGURA 34), mostram que não ocorreu a formação de gradientes de temperatura no leito que é ocasionado devido a liberação de calor metabólico pelo microrganismo e as restrições de remoção de calor do leito sólido. Isso pode ter ocorrido devido a temperatura do ar de entrada estar muito abaixo da temperatura ótima de 34 °C e também pela atividade de água do leito estar abaixo do ótimo para o crescimento do fungo.

Neste experimento foram monitoradas as umidades em várias alturas do leito. As umidades tanto do experimento como as previstas pelo modelo são mostradas na FIGURA 35.

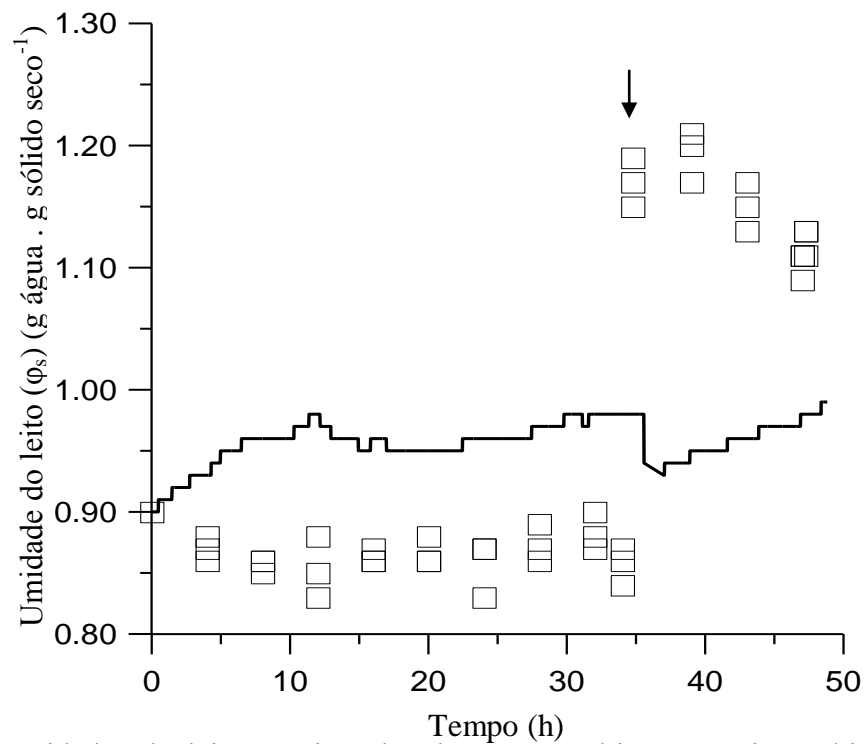


FIGURA 35. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (□) umidade a 5 cm, (—) umidade pelo modelo a 5 cm. $R = 0,19$.

Para a altura de 5 cm, as previsões do modelo foram em torno de 10 – 20 % de diferença em relação a umidade obtida experimentalmente. Nesta altura, a maior parte do leito ficou compactado no fundo do biorreator.

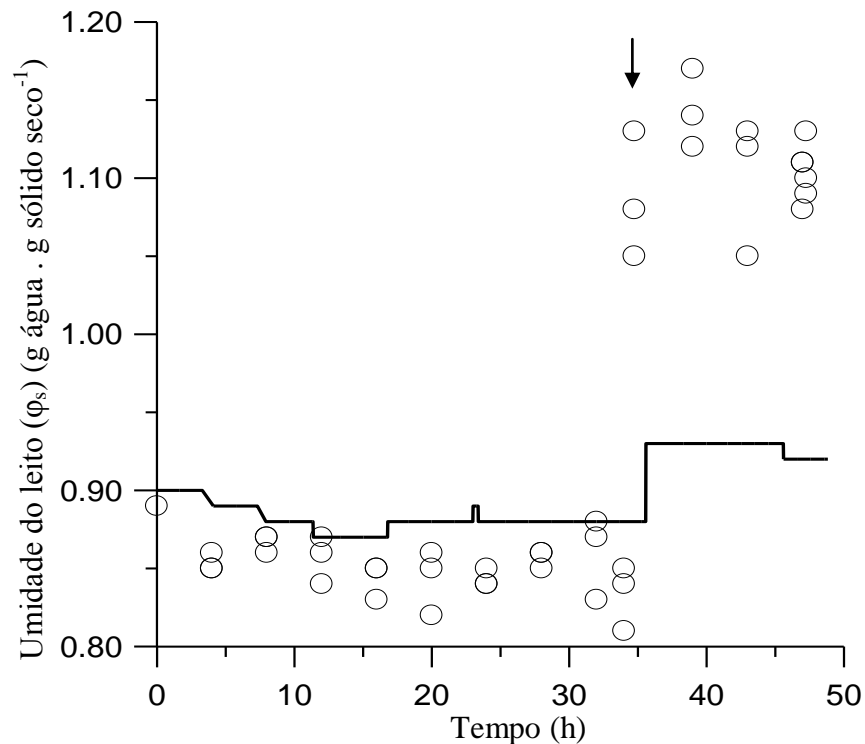


FIGURA 36. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (○) umidade a 10-20 cm, (—) umidade pelo modelo a 18 cm. $R = 0,85$.

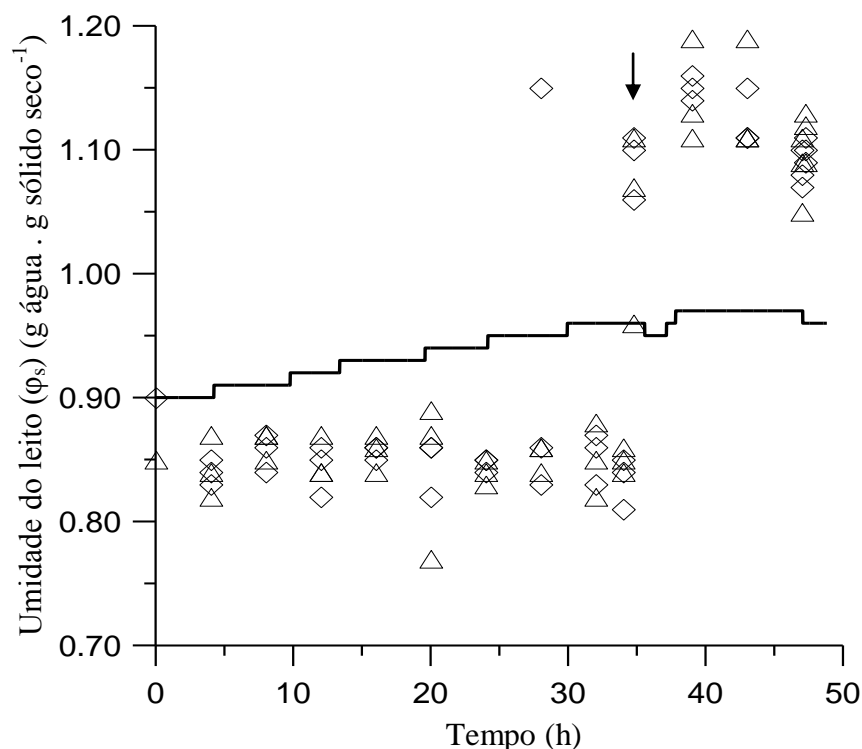


FIGURA 37. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em soja no biorreator. (Δ) umidade a 25-30 cm, (\diamond) umidade a 30 - 35 cm, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. $R = 0,67$.

Em todas as posições do leito, além da temperatura estar abaixo da temperatura ótima para o crescimento do microrganismo, outro fator limitante para o crescimento pode ter sido a baixa umidade do leito que não forneceu água livre suficiente para proporcionar um crescimento, sendo que o leito possuía uma atividade água média para a temperatura de 27 °C igual $a_{ws} = 0,96$, onde nessa atividade água a taxa de crescimento do fungo corresponde a 40% da taxa de crescimento ótimo com $a_{ws} = 0,99$ (GLENN E ROGERS, 1988).

Como uma tentativa de aumentar a umidade do leito, foi adicionado em torno de 14 kg de água e o biorreator foi agitado durante 15 min para uma melhor homogeneização. Desta forma, com o aumento da umidade do leito percebeu-se o aumento da temperatura do leito, alcançando uma temperatura de aproximadamente 28,5 °C no topo e também a formação de gradientes de temperatura nas 12 horas seguintes após a adição de água, o que evidencia indiretamente o crescimento do microrganismo devido à liberação de calor metabólico.

Para as previsões do modelo ocorreram variações entre os coeficientes de correlação para a diferentes posições, no caso da altura de 5 cm, onde foi obtido o menor coeficiente, pode ter

sido devido a compactação do leito no fundo do biorreator e também pela não correta homogeneização durante o período de agitação após 36 horas de cultivo, com a aderência do substrato no fundo do biorreator. Com isso, as previsões do modelo nesse experimento acabam divergindo principalmente após o período de agitação, pois o modelo considera que o leito é homogêneo, com porosidade constante e com o fluxo de ar igual através do leito, sendo que isso não foi conseguido experimentalmente.

5.5.2. Cultivo do Fungo *R. oryzae* em Trigo Moído

5.5.2.1. Experimento 1

Da mesma forma, também foram realizados experimentos em trigo moído para o cultivo do fungo *R. oryzae*. A finalidade do uso de um diferente substrato foi avaliar as previsões de umidade do modelo em um processo que utilizasse um leito com propriedades físico-químicas diferentes das da soja.

Para o experimento 1, foi utilizado aproximadamente 58 kg de trigo moído adicionados de 1 kg água . kg de substrato seco⁻¹. Para garantir uma absorção homogênea da água pelo substrato, a cada hora a mistura foi agitada, num intervalo de 4 horas, e depois, a mistura foi deixada em repouso durante 12 horas (*overnight*).

Para o monitoramento da umidade durante o experimento foram coletadas amostras somente do topo do leito, em triplicata. Com a determinação das propriedades do substrato, foi possível inserir esses parâmetros no modelo e durante o experimento utilizou-se as seguintes condições operacionais, conforme a TABELA 11:

TABELA 11. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 1 com trigo moído.

Variáveis	Valores	
Fluxo do Ar de Entrada (G)	267,28 kg de ar seco . s ⁻¹ . m ⁻²	Determinado
Pressão da Fase Gasosa (P)	101325 Pa	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Gás Seco (c _{pg})	1005 J . kg de ar seco ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Vapor de Água (c _{pv})	1791 J . kg de vapor água ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Sólido Seco (c _{ps})	1590 J . kg de sólido seco ⁻¹ . K ⁻¹	SWEAT (1986)
Capacidade Calorífica da Água Líquida (c _{pw})	4184 J . kg de água líquida ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Densidade da Fase Gasosa (ρ _g)	0,964 kg de ar seco . m ⁻³	HIMMELBLAU (1996)
Densidade do Substrato Úmido (ρ _{su})	1060 kg de subst. úmido . m de subst.úmido ⁻³	Determinado
	0,2 m ³ de espaço vazio . m de leito ⁻³	Determinado
Fração de espaço vazio (ε)		
C1, C2, C3, C4, C5	0,245; 0,016; 2,129; 0,005; 31,163.	Determinado CALÇADA (1998)
Entalpia de Vaporização da Água (λ)	2414300 J . kg de água ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Umidade Inicial do Substrato (φ _{so})	1,06 kg de água . kg de sólido seco ⁻¹	Determinado
Coeficiente de rendimento de calor em função ao consumo de oxigênio (Y _{Q/O₂})	5,19.10 ⁵ J . mol ⁻¹ de O ₂	(BAILEY e OLLIS, 1986)
Coeficiente de rendimento de água em função ao consumo de oxigênio (Y _{W/O₂})	1,2 mol de H ₂ O . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Coeficiente de rendimento de gás carbônico em função ao consumo de oxigênio (Y _{CO₂/O₂})	1 mol de CO ₂ . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Massa molar da Água (MH ₂ O)	0,018 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do CO ₂ (MCO ₂)	0,044 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do O ₂ (MO ₂)	0,032 kg . mol ⁻¹	
Massa molar do Ar (MAr)	0,029 kg . mol ⁻¹	

Os resultados de temperatura monitorados foram filtrados pelo modelo matemático e são mostrados na FIGURA 38.

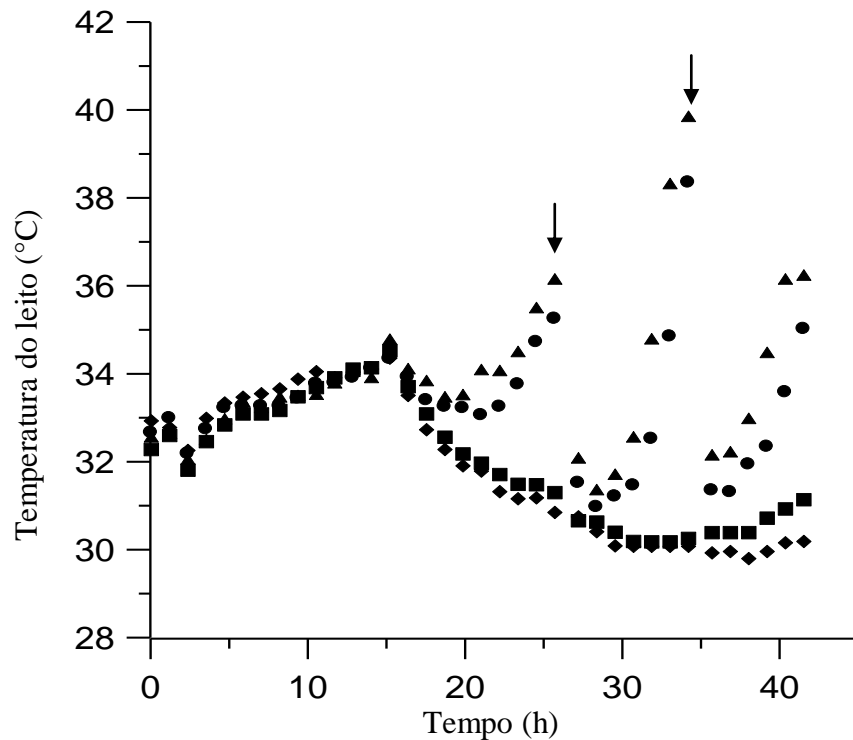


FIGURA 38. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.

Neste experimento conseguiu-se manter a temperatura do ar de entrada entre os valores de 30 a 35 °C, sendo esses valores ótimos para o crescimento do fungo *R. oryzae*. Nas primeiras 15 horas de cultivo houve um aquecimento do leito devido o aquecimento que foi imposto nas caixas de água do sistema de umidificação do ar. Com o aquecimento do ar, foi possível evidenciar a influência dessa variação, sendo observado com isso que havia um equilíbrio entre a temperatura do ar de entrada com as temperaturas do leito durante a fase de adaptação do microrganismo conhecida como fase *lag*.

Com o início da atividade metabólica do fungo ocorreu aumento da temperatura do leito, chegando a aproximadamente 37 °C, onde foi feita a primeira agitação às 26 horas do cultivo, restabelecendo a temperatura do leito para aproximadamente 31 °C. Após a primeira agitação, a temperatura do ar foi mantida entre 30 - 31 °C, mas como a atividade metabólica do fungo ainda estava alta, ocorreu um aumento de temperatura e a formação de gradientes, chegando a temperatura 40,5 °C no topo do leito em aproximadamente 8 horas, com um $\Delta T = 9,5$ °C, onde se procedeu a segunda agitação às 34 horas de cultivo para restabelecer a temperatura do leito para 30 °C e ao mesmo tempo para permitir a descompactação do mesmo para evitar a

formação de caminhos preferenciais do fluxo do ar que pode prejudicar a eficiência na remoção do calor do leito.

Como o microrganismo foi submetido a temperaturas elevadas durante o experimento, principalmente entre a primeira e a segunda agitação aonde a temperatura do topo do leito chegou a valores de 40,5 °C, cujo são deletérias para os componentes bioquímicos, como as enzimas que participam do metabolismo, a elevação de temperatura e a formação de gradientes foram mais lentas devidas estas deficiências após a segunda agitação (DALSENTER et al., 2005), sendo que até o final do experimento, em 8 horas após a segunda agitação, temos um $\Delta T = 6,5$ °C.

Também foi monitorada experimentalmente a umidade no topo do leito, sendo esses valores demonstrados juntamente com a previsão do modelo na FIGURA 39.

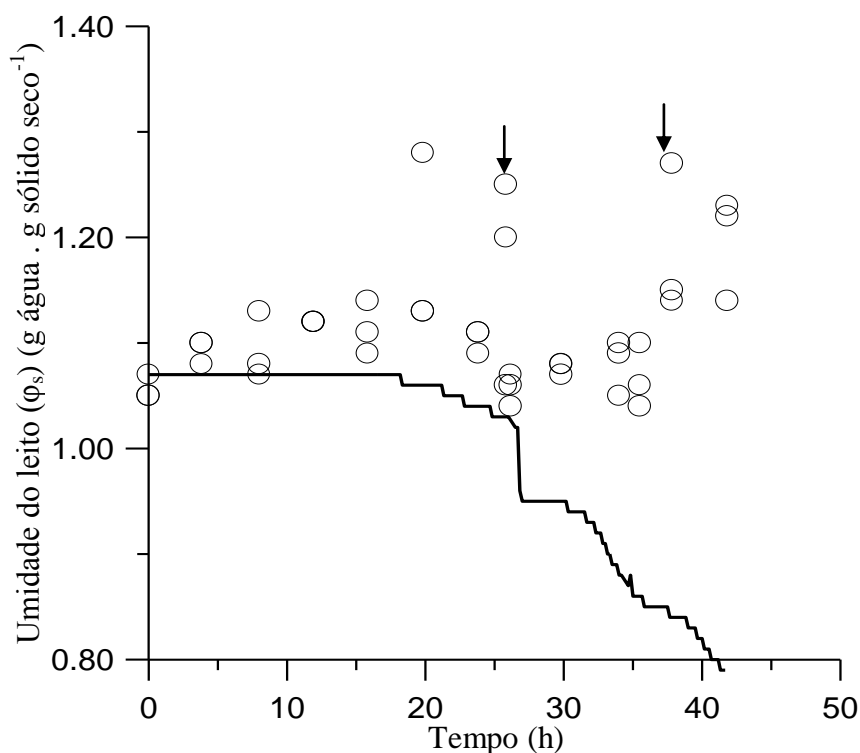


FIGURA 39. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (○) umidade a 33 cm, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. R = 0,33.

A estimativa de umidade calculada pelo modelo, em relação aos dados experimentais de umidade durante as primeiras 24 horas de cultivo, teve neste período um coeficiente de

correlação $R = 0,52$. Após a primeira agitação, a estimativa do modelo teve um desvio significativo em relação aos dados experimentais.

Esse desvio ocasionado após a primeira agitação pode ter ocorrido devido a não correta homogeneização do leito, pois o mesmo estava compactado, o que ocasionou a formação de blocos consistentes e pode ter interferido na amostragem para a determinação da umidade do leito.

Mesmo assim, após a primeira agitação os dados experimentais de umidade tendem a permanecer constante e ainda aumentam após a segunda agitação, sendo que na previsão do modelo a umidade do topo do leito tende a diminuir durante o cultivo. Um fator que pode ter influenciado significativamente no experimento seria a alteração das propriedades do leito, principalmente da isoterma devido o crescimento do microrganismo, que desta forma aumentaria a capacidade do leito em reter água para uma determinada atividade água e temperatura, sendo que o modelo não leva isso em consideração.

5.5.2.2. Experimento 2

No segundo experimento de cultivo em trigo moído, foi utilizado aproximadamente 58 kg de trigo moído adicionados de 1,2 kg-água . kg-substrato-seco⁻¹. A cada hora a mistura substrato mais água foi agitada, durante um período de 4 horas, para ocorrer uma absorção homogênea da água pelo substrato, após isso a mistura foi deixada em repouso durante um período de 12 horas (*overnight*).

Neste experimento foi realizado o monitoramento da umidade em diferentes posições do leito durante o cultivo do fungo. Para este experimento utilizou-se as seguintes condições operacionais, conforme a TABELA 12:

TABELA 12. Condições operacionais utilizadas durante o experimento 2 com trigo moído.

Variáveis	Valores	
Fluxo do Ar de Entrada (G)	267,28 kg de ar seco . s ⁻¹ . m ⁻²	Determinado
Pressão da Fase Gasosa (P)	101325 Pa	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Gás Seco (c _{pg})	1005 J . kg de ar seco ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Vapor de Água (c _{pv})	1791 J . kg de vapor água ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Capacidade Calorífica do Sólido Seco (c _{ps})	1590 J . kg de sólido seco ⁻¹ . K ⁻¹	SWEAT (1986)
Capacidade Calorífica da Água Líquida (c _{pw})	4184 J . kg de água líquida ⁻¹ . K ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Densidade da Fase Gasosa (ρ _g)	0,964 kg de ar seco . m ⁻³	HIMMELBLAU (1996)
Densidade do Substrato Úmido (ρ _{su})	1060 kg de subst. úmido . m de subst.úmido ⁻³	Determinado
	0,2 m ³ de espaço vazio . m de leito ⁻³	Determinado
Fração de espaço vazio (ε)		
C1, C2, C3, C4, C5	0,245; 0,016; 2,129; 0,005; 31,163.	Determinado CALÇADA (1998)
Entalpia de Vaporização da Água (λ)	2414300 J . kg de água ⁻¹	HIMMELBLAU (1996)
Umidade Inicial do Substrato (φ _{so})	1,33 kg de água . kg de sólido seco ⁻¹	Determinado
Coeficiente de rendimento de calor em função ao consumo de oxigênio (Y _{Q/O₂})	5,19.10 ⁵ J . mol ⁻¹ de O ₂	(BAILEY e OLLIS, 1986)
Coeficiente de rendimento de água em função ao consumo de oxigênio (Y _{W/O₂})	1,2 mol de H ₂ O . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Coeficiente de rendimento de gás carbônico em função ao consumo de oxigênio (Y _{CO₂/O₂})	1 mol de CO ₂ . mol ⁻¹ O ₂	(NAGEL et al., 2001).
Massa molar da Água (MH ₂ O)	0,018 kg . mol ⁻¹	Escolhido
Massa molar do CO ₂ (MCO ₂)	0,044 kg . mol ⁻¹	Escolhido
Massa molar do O ₂ (MO ₂)	0,032 kg . mol ⁻¹	Escolhido
Massa molar do Ar (MAr)	0,029 kg . mol ⁻¹	Escolhido

Os valores de temperatura filtrados pelo modelo matemático são mostrados na FIGURA 40.

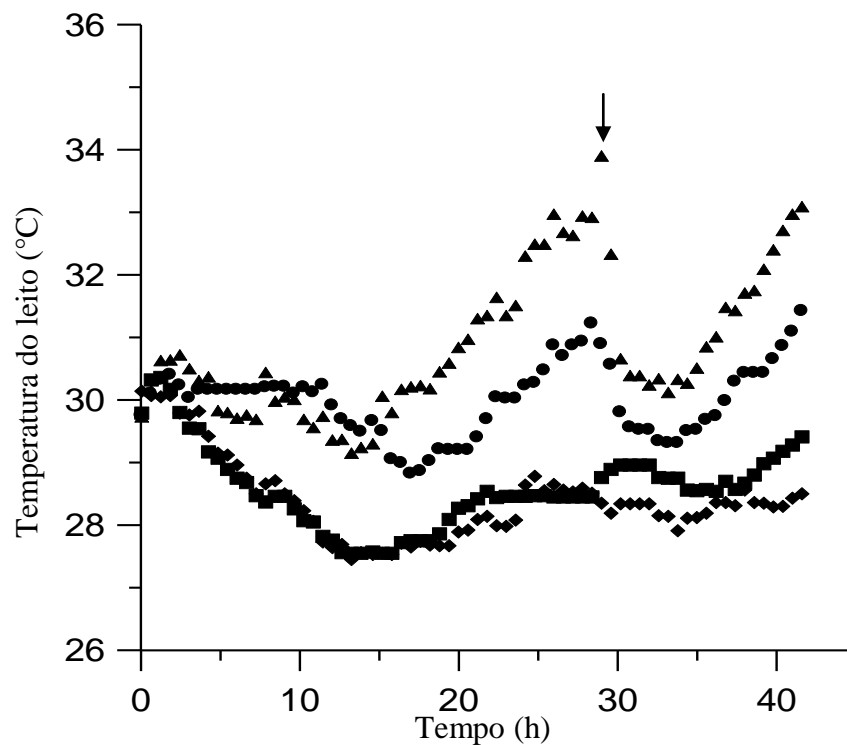


FIGURA 40. Temperaturas monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (□) temperatura a 5 cm, (■) temperatura filtrada a 5cm, (●) temperatura filtrada a 18 cm, (▲) temperatura filtrada a 33 cm, (◆) temperatura filtrada do ar de entrada.

No experimento 2, onde cultivou-se o fungo em trigo moído, ocorreu um aumento da temperatura do leito, atingindo a valores máximos de 34 °C no topo do leito em 28 horas, como uma diferença de temperatura de aproximadamente 5 °C em relação à temperatura do ar de entrada. Para o experimento 1, esse resultado em relação a mesma diferença de 5 °C entre a temperatura do topo e a temperatura do ar de entrada para o experimento 1, foi obtido em 24 horas, o que demonstra que a atividade metabólica do microrganismo foi ótima para temperaturas do ar de entrada entre 30 °C e 34 °C, conforme utilizado no experimento 1.

A seguir estão demonstradas as previsões do modelo e os dados experimentais de umidade para cada altura do leito.

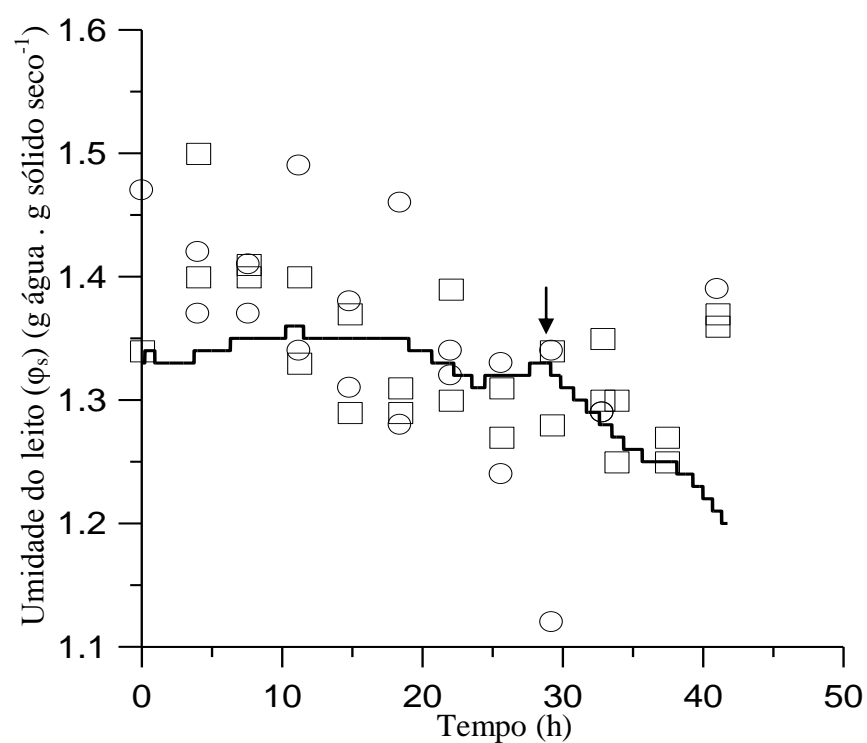


FIGURA 41. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (\square) umidade a 0-5 cm, (\circ) umidade a 5-10 cm, (—) umidade pelo modelo a 5 cm. $R = 0,41$.

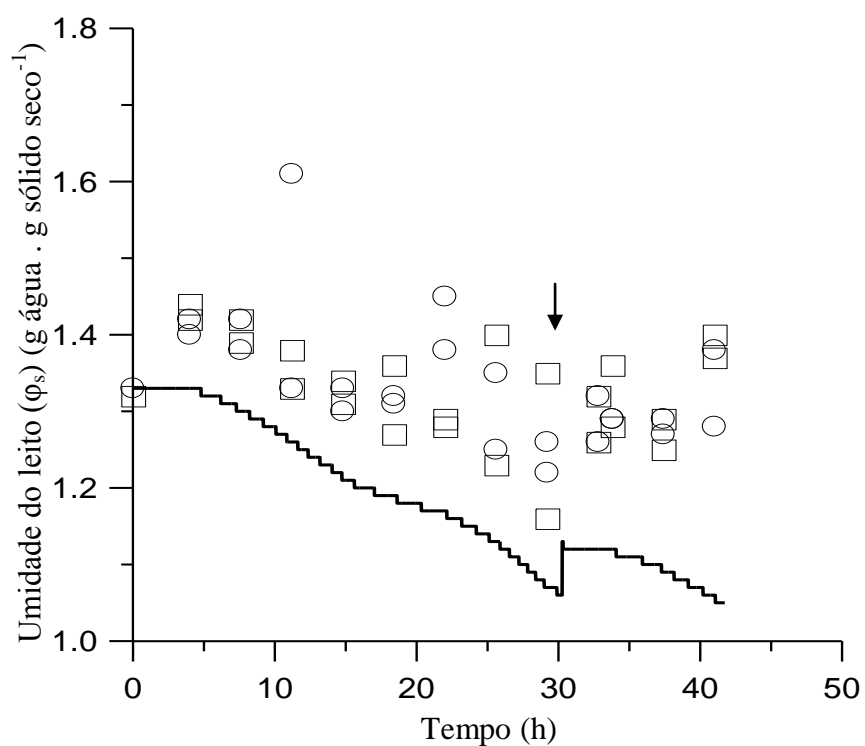


FIGURA 42. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (\square) umidade a 10-15 cm, (\circ) umidade a 15-20 cm, (—) umidade pelo modelo a 18 cm. $R = 0,82$.

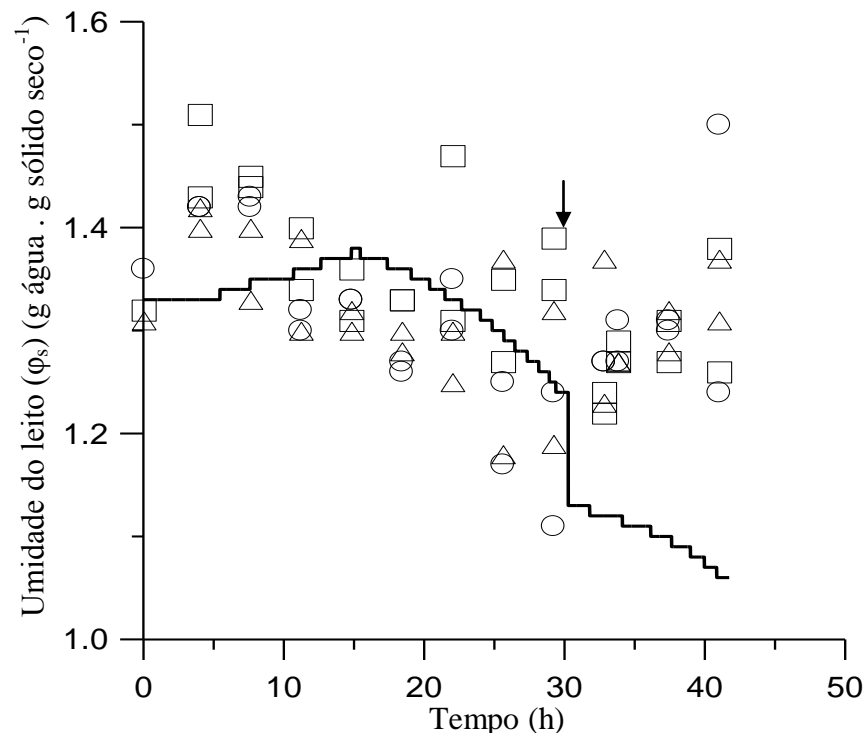


FIGURA 43. Umidades do leito monitoradas durante o cultivo em trigo moído no biorreator. (□) umidade a 20-25 cm, (○) umidade a 25-30 cm, (Δ) umidade a 30-35 cm, (—) umidade pelo modelo a 33 cm. $R = 0,40$.

O evento de agitação foi realizado da mesma forma descrita na seção 3.11.4.4. para que houve-se uma diminuição da temperatura do leito e também uma descompactação. Mas ficou evidente que após o período de agitação o leito estava ainda compactado, principalmente no fundo do biorreator, o que não permite uma adequada homogeneização do leito e assim acaba influenciando na amostragem para a determinação de umidade.

Neste caso, o nível da eficiência de homogeneização do leito nos períodos de agitação deve ser investigado com mais cautela, sendo necessário estabelecer um novo procedimento de agitação para conseguir uma correta homogeneização.

Outro importante fator que influenciou nos experimentos foi o crescimento do fungo com a formação de biomassa, o qual altera as propriedades do leito durante o cultivo. Geralmente, após agitação, a amostragem dos dados indica um aumento da umidade do leito nas diferentes posições do leito e as previsões do modelo indicam uma diminuição da umidade, ocorrendo

assim uma divergência entre as previsões do modelo em relação aos dados de umidade durante o cultivo após a primeira agitação.

Com base nos resultados, para determinação da isoterma dos substratos, verificou-se o fato de que o crescimento de contaminantes durante o experimento realmente altera a isoterma dos substratos, o que indica a necessidade de incluir a esta isoterma da biomassa dentro do modelo matemático para então realizar novas previsões da umidade do leito do biorreator durante o crescimento do fungo *R. oryzae*.

Sabendo que o crescimento de biomassa altera a isoterma do substrato (MARQUES et al., 2006), foram então estudadas diferentes possibilidades para se determinar a isoterma da biomassa para inclusão no modelo de inferência. Dentre essas possibilidades podemos utilizar alguns métodos indiretos para estimar a biomassa nos estudos da fermentação sólida através da determinação de proteínas, glucosaminas (NOPHARATANA, 1999) ou pelo consumo de O₂ para podermos determinar a biomassa. Porém nenhum destes métodos é realmente confiável para o substrato e o microrganismo utilizados neste projeto.

Por isso, tentou-se desenvolver uma metodologia para determinação da isoterma para biomassa pura. No tratamento da biomassa, levou-se em conta que deveria haver inibição do metabolismo do fungo, para inibir o crescimento ou até mesmo as reações de autólise que alteram a composição e quantidade de biomassa ao longo do tempo, mas essa inibição não poderia alterar de forma significativa as propriedades da biomassa. Nesse tratamento, utilizou-se luz ultravioleta a 280 nm como uma forma de inibir o metabolismo do microrganismo sem alterar sua composição e estrutura de forma significativa (MARQUES, 2005), mas como havia uma quantidade significativa de biomassa a inibição com luz ultravioleta não funcionou, pois está tem somente ação superficial com no máximo 1 mm de profundidade de ação.

Em relação aos resultados de estimativa de umidade obtidos pelo modelo de inferência, a simplificação utilizada neste modelo que considerada o equilíbrio entre a fase gasosa e a fase sólida do leito não é garantida. O equilíbrio entre as duas fases pode ser afetado por diversos fatores, como o fluxo de ar de entrada que neste é calculada considerando a utilização de ar seco, sendo que experimentalmente eram obtidos um fluxo de ar com umidade ambiente desconhecida. Com isso, a velocidade superficial do ar altera durante o experimento o que

conseqüentemente altera a taxa de liberação de calor metabólico e a taxa de secagem do leito (WEBER, 2002).

Além de variação do fluxo do ar de entrada, outro fator de importante influência seria a alteração da porosidade do leito devido à agregação das partículas sólidas provocada pelo crescimento do microrganismo, o qual reduz a área efetiva entre as duas fases. Esta variação pode ter contribuído negativamente no equilíbrio entre as duas fases, sendo que no modelo esta variável foi considerada constante ao longo do cultivo.

Uma consideração que pode não ser válida também experimentalmente seria a manutenção da saturação da umidade do ar. Caso o ar de saída não esteja totalmente saturado, isto poderá causar uma influência negativa durante as previsões do modelo, pois com o ar saindo do leito abaixo da saturação ocorre uma menor de água do leito em relação ao que é considerado pelo modelo com o ar saindo saturado de água. Da mesma forma, a determinação da produção do calor metabólico determinado na Eq. (19), considera em um dos seus termos a liberação de calor devido a evaporação para o ar saturado (H_{sat}), sendo que caso a saturação do ar não seja alcançada no cultivo, isto acaba influenciando deste a determinação da matéria seca e no balanço de água que toma como base a produção de calor metabólico para cálculo das demais variáveis pelo modelo. Para avaliação destes desvios em relação a saturação do ar que podem ocorrer durante o experimento, pode-se utilizar sensores de umidade na saída do ar para verificação da umidade, lembrando que os sensores atuais não funcionam de forma confiável para umidades acima de 95%.

Entretanto, a simplificação utilizada pelo modelo de inferência apresentado difere em relação aos modelos de estimativa *on-line* em relação as variáveis monitoradas no processo que utilizam o monitoramento do O_2 consumido, CO_2 produzido e a temperatura de saída do ar (NAGEL et. al, 2001), o consumo de O_2 , a taxa de produção de CO_2 , a temperatura e umidade do ar de entrada (PEÑA Y LILLO et. al, 2001). Em relação ao modelo que somente utilizou o monitoramento da temperatura por termopares e considera que a atividade de água do substrato é aproximadamente 1 (KHANAHMADI et. al, 2006), o modelo apresentado difere quanto a consideração que a atividade de água entre a fase sólida e a fase gasosa está em equilíbrio e que a atividade de água do substrato é obtida através da isoterma do substrato determinada experimentalmente no laboratório.

A utilização de somente o monitoramento das variáveis respirométricas como o O_2 e CO_2 pode não ser adequada para leito com alturas onde ocorrem a formação de gradientes de temperatura e conseqüentemente gradientes de umidade. Modelos que utilizam estas variáveis como parâmetros de entrada somente são capazes de estimar a média da umidade do leito. Nos casos onde ocorrem esses gradientes, tanto de temperatura como de umidade do leito, algumas partes do leito podem atingir valores que podem limitar o crescimento do microrganismo. Assim, o uso de termopares em diversas posições do leito e utilizando a temperatura monitorada como parâmetro de entrada, como utilizado pelo modelo de inferência apresentado, pode nos fornecer uma previsão da umidade nas diferentes seções do leito entre dois termopares.

5.6. Análise de Sensibilidade do Modelo

Sabendo que durante a metodologia aplicada para a determinação da isoterma podem ocorrer erros experimentais, está análise de variação da isoterma foi necessária para podermos avaliar o efeito desses erros ou até mesmo para investigar a influência dessas variações que podem ser promovidas pelo crescimento do fungo durante seu cultivo na determinação indireta da umidade pelo modelo matemático. A análise de sensibilidade do modelo foi realizada através de alterações nos valores da isoterma determinada experimentalmente tanto para soja como para o trigo moído.

Para isso, foi realizado um planejamento fatorial, onde a partir da variação dos valores da isoterma determinada experimentalmente foram determinados outros parâmetros da isoterma de Calçada (1998) correspondentes para cada temperatura utilizando o *software* TKSolver. Com o uso desses novos parâmetros compararam-se os resultados previstos de umidade com os resultados de umidade obtidos através do cultivo do fungo em soja e em trigo. Essa comparação dos resultados foi analisada a partir do coeficiente de correlação para cada variação de isoterma.

Desta forma, a partir das variações de $\pm 10\%$ e $\pm 20\%$ na isoterma foram obtidos valores dos parâmetros C1, C2, C3, C4 e C5 da isoterma de Calçada (1998) e a partir disso foram estimadas as umidades em três alturas do leito (5, 18 e 33 cm) pelo modelo de inferência e o

fator de correlação entre os resultados de umidade foi determinado em relação aos dados de umidade durante o cultivo, sendo utilizado o *software* TKSolver, sub-rotina CORR, sendo esses resultados mostrados na TABELA 13.

TABELA 13. Avaliação da sensibilidade do modelo em relação a variações da isoterma da soja.

Variação na Isoterma da Soja	Parâmetros da Isoterma de Calçada (1998)	R (%) Altura (0-10 cm)	R (%) Altura (10-20 cm)	R (%) Altura (20-30 cm)
0,8	C1 = -25,349; C2 = 0,889; C3 = 3,345; C4 = 0,549; C5 = 411,199	22,75	74,46	67,31
0,9	C1 = -25,741; C2 = 0,824; C3 = 3,346; C4 = 0,549; C5 = 411,174	22,24	77,96	65,91
1	C1 = -26,072; C2 = 0,766; C3 = 3,351; C4 = 0,549; C5 = 410,894	19,24	84,71	67,31
1,1	C1 = -33,877; C2 = 0,845; C3 = 4,252; C4=0,697; C5 = 521,769	19,24	83,99	71,17
1,2	C1 = -26,072; C2 = 0,766; C3 = 3,351; C4 = 0,549; C5 = 410,894	19,24	83,07	69,39

Essas variações impostas na isoterma da soja mostram que ocorreu aumento no coeficiente de correlação para as alturas próximas a base do leito nas variações de isoterma menores que 1. Entretanto, para as variações na isoterma maiores que 1, houve uma melhora nos fatores de correlação para as umidades previstas pelo modelo em relação as umidades durante o cultivo para o topo do leito e também os coeficientes em relação a altura intermediária permaneceram praticamente constantes.

TABELA 14. Avaliação da sensibilidade do modelo em relação a variações da isoterma do trigo.

Variação na Isoterma do trigo	Parâmetros da Isoterma de Calçada (1998)	R (%) Altura (0-10 cm)	R (%) Altura (10-20 cm)	R (%) Altura (20-30 cm)
0,8	C1 = 0,720; C2 = 0,017; C3 = 2,129; C4 = 0,005; C5 = 31,164	43,76	70,33	41,58
0,9	C1 = 0,469; C2 = 0,016; C3 = 2,129; C4 = 0,005; C5 = 31,163	45,43	70,83	41,58
1	C1 = 0,245; C2 = 0,016 C3 = 2,129; C4 = 0,005; C5 = 31,163	41,46	82,96	40,38
1,1	C1 = 0,042; C2 = 0,016; C3 = 2,129; C4 = 0,005; C5 = 31,164	43,78	71,31	41,88
1,2	C1 = -0,143; C2 = 0,015; C3 = 2,129; C4 = 0,005; C5 = 31,163	40,01	69,74	42,96

Para as variações na isoterma do trigo moído foram obtidos aumento no coeficiente de correlação entre as umidades previstas pelo modelo e as umidades do experimento para alturas também próximas a base do leito nas variações de isoterma menores que 1. Para as variações na isoterma maiores que 1, houve uma melhora nos fatores de correlação para as umidades previstas pelo modelo em relação as umidades durante o cultivo para o topo do leito. Quanto aos coeficientes de correlação em relação a altura intermediária do leito houve uma diminuição significativa. Os resultados apresentados para investigar o efeito das variações que podem acontecer na determinação da isoterma na previsão da umidade pelo modelo necessitam ser mais bem investigado para variações na isoterma ainda maiores. Com base nos resultados obtidos nessa análise podemos ter uma indicação de como essas variações podem afetar nas previsões do modelo, principalmente avaliar qual efeito teria o crescimento da biomassa durante os experimentos do cultivo que variam a isoterma do leito.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou o desenvolvimento de um modelo para determinação indireta da umidade do leito de um biorreator de fermentação em estado sólido de escala piloto a partir da temperatura monitorada do leito a da temperatura do ar de entrada e saída.

Como o modelo de inferência necessita de algumas propriedades do leito, em laboratório foram desenvolvidas metodologias para a determinação desses parâmetros. Então, para cada tipo de substrato foi realizado a determinação da porosidade do leito, calor específico, densidade e isoterma do substrato em diferentes temperaturas. Com base nos ensaios em laboratório foi possível ter uma indicação da viabilidade de uso de determinado substrato, sendo utilizados nos experimentos de cultivo do fungo sobre soja ou em trigo moído no biorreator.

Nos experimentos onde se utilizou um excesso de água para umidificar o substrato, este excesso favoreceu o crescimento de contaminantes, como no caso do experimento 1 utilizando a soja como substrato. Além de a alta umidade inicial favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos ocorreu também em alguns ensaios de laboratório a gelatinização do amido quando se utilizou trigo moído, sendo que neste caso devido à eliminação da porosidade do leito a passagem do fluxo de ar seria interrompida. Por isso, torna-se necessário investigar todas as propriedades do substrato em diferentes teores de umidade para determinar se o mesmo poderá ser utilizado para a formação do leito no biorreator de escala piloto.

Determinado o substrato, outro passo importante foi a produção do inóculo para o biorreator. Como o sistema utilizado não permite trabalhar de forma esterilizada, a estratégia adotada para garantir o crescimento do microrganismo de interesse foi o de utilizar um inóculo com alta concentração de esporos em torno de 1.10^6 esporos . g-subst-seco⁻¹, assim se garantiu a sua prevalência durante o cultivo.

Estas etapas que antecedem o experimento de cultivo são de muita importância para não se perca tempo nem dinheiro devido aos gastos e esforços para se trabalhar em escala piloto. Considerando os experimentos de cultivo, então é necessário realizar a conferência dos

diferentes equipamentos assim como a calibração dos sensores para a obtenção de dados experimentais mais confiáveis e para a eliminação de erros grosseiros, sendo estes dados utilizados pelo modelo de inferência.

A partir das temperaturas obtidas do experimento de cultivo nos diferentes substratos, primeiramente foi feito um tratamento desses dados para então eliminar erros devido a interferências externas, conhecidas como ruídos, através de uma sequência de filtros digitais. A partir disso as temperaturas monitoradas foram utilizadas como parâmetros de entrada para a determinação indireta da umidade do leito através do modelo que considera o equilíbrio entre a fase sólida e a fase gasosa em termos de temperatura e atividade água.

As previsões do modelo em relação aos dados experimentais obtidos para a soja no experimento 1 obtiveram um fator de correlação de 0,86, indicando num primeiro momento a possibilidade da utilização desse modelo para a determinação da umidade. No experimento 2, onde se utilizou soja como substrato, devido atividade água do substrato estar abaixo do ótimo para o crescimento do fungo *R. oryzae* não houve aumento da temperatura do leito. Uma estratégia adotada foi a adição de água ao leito no período de agitação, sendo que após a agitação houve um desvio significativo em relação as previsões de umidade para diferentes alturas do leito e os resultados de umidade obtidos experimentalmente.

Para os resultados obtidos a partir do crescimento do fungo sobre trigo moído, no experimento 1 o coeficiente de correlação entre os dados experimentais de umidade e as previsões do modelo foram de 0,56 até o primeiro evento de agitação. Após isso as previsões do modelo divergiram, prevendo uma maior taxa de secagem do leito ao longo do tempo em relação aos resultados experimentais. Para o experimento 2, os fatores de correlação entre as previsões do modelo e os dados de umidade experimentais foram melhores para as diferentes posições do leito, mas de qualquer forma, após o evento de agitação o modelo continuou prevendo uma maior taxa de secagem do leito em relação aos resultados do cultivo.

Para aprimoramento do modelo de inferência, foram investigadas as variações que a presença de biomassa pode provocar na isoterma do leito do substrato. Para isso, foram realizadas análises para avaliar a influência disso nas previsões de umidade comparadas com as umidades obtidas experimentalmente. Para as variações realizadas na isoterma da soja em +10

e +20%, no geral houve uma melhora na concordância das previsões com os resultados de umidade do cultivo assim como para as variações da isoterma de trigo moído.

Nos modelos que utilizaram as variáveis respirométricas, como o O_2 e CO_2 , para determinação do conteúdo de umidade da fase sólida, obtiveram variações entre a previsão do modelo e os dados experimentais de 30% no final do experimento (PEÑA Y LILLO et. al, 2001), porém esses modelos não eram capazes de prever os gradientes de umidade que são formados no interior do leito. Assim, além de ser uma maneira mais econômica a utilização de termopares, a utilização das temperaturas nas diferentes posições do leito como variáveis de entrada do modelo de inferência permite a previsão da umidade nas diferentes posições do leito.

Entretanto, para a otimização do modelo, serão necessários algumas tomadas das variáveis de entrada para evitar erros grosseiros como a determinação do fluxo do ar seco de entrada, pois a vazão medida durante o experimento deverá ser monitorada junto com um sensor de umidade e temperatura do ar de entrada (sensor RHT), para então determinar com precisão a vazão do ar seco que entra no biorreator. Em estudos futuros é sugerida a verificação da saturação do ar ao longo do leito que é considerado neste modelo e também o monitoramento de outras variáveis do processo para então comparar as previsões do modelo e assim poder otimizá-lo, como por exemplo, o O_2 consumido.

7. SUGESTÕES E TRABALHOS FUTUROS

Para a otimização do modelo de inferência deverão ser realizados algumas determinações de outras variáveis do processo, como por exemplo, a vazão do ar de entrada que é utilizada pelo modelo. Nos experimentos utilizou-se a vazão do ar com umidade desconhecida e para os cálculos com o modelo assumiu-se que a vazão do ar seco seria a mesma vazão determinada experimentalmente. Neste caso, pode-se então utilizar um medidor de umidade e temperatura (sensor RHT), antes do medidor de vazão instalado junto ao filtro de ar do processo, para registrar as temperaturas e umidades do ar que varia de acordo com as condições ambientais. Com isso, utilizando a lei dos gases perfeitos, será possível determinar a vazão de ar seco na entrada ao longo do experimento.

Além disso, poderão ser feitos o monitoramento de outras variáveis do processo, como a taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 , para investigar a consistência do modelo através da comparação entre os valores obtidos do experimento com os valores estimados pelo modelo ao longo do cultivo no biorreator. Outro fator importante será a incorporação do efeito da biomassa sobre a isoterma do leito, e a incorporação de equações da cinética de crescimento do fungo *R. oryzae* no modelo de inferência, para então comparar as estimativas da umidade do leito com os valores de umidade obtidos nos diferentes experimentos de cultivo.

Dentre as considerações feitas no desenvolvimento do modelo apresentado, a consideração da saturação do ar no leito, sendo necessário o seu monitoramento através da utilização de um sistema de monitoramento da umidade relativa próximo à saturação e temperatura do ar na entrada e saída do biorreator. Outros procedimentos operacionais também devem ser revistos, como por exemplo, a padronização dos eventos de agitação para que ocorra uma correta homogeneização do leito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHLEY, V.M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal** 3(2), p. 141-150, (1999).

AURIA, R.; MORALES, M.; VILLEGAS, E.; REVAH, S. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. **Biotechnol Bioeng** (41), p.1007-1013, (1993).

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. McGraw-Hill Education, p. 292-293, (1986).

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochem.** (38), p. 881-896, (2003).

BOYETTE, C.D.; QUIMBY JR., P.C.; CONNICK JR., W.J.; DAIGLE, D.J.; FULGHAM, F.E. Progress in the production, formulation and application of mycoherbicides. D.O. TeBeest (ed), **Microbial Control of Weeds**, p. 209-222, Chapman & Hall, New York, (1991).

BRODGESELL, A.; LIPTÁK, B.G. Analytical instrumentation (moisture in solids). Lipták BG (ed) **Instrument engineers' handbook: process measurement and analysis**. Chilton Book Company, Radnor, Pennsylvania, p. 1079-1084, (1995).

BROOKER, D. V.; BAKKER-ARKEMA, F. W., HALL, C. W. **Drying Cereal Grains**. The Avi Publishing Company, Inc., Westport, (1974).

CALÇADA, L.A. **Secagem de materiais granulares porosos**. Tese (PhD), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, (1998).

CELESTINO, S. M. C. **Transferência de Calor e Massa em Leito Deslizante e Escoamentos Concorrentes: Secagem de Sementes de Soja**. Universidade Federal de Uberlândia, (1998).

CHIRIFE, J.; RESNIK, S.L. Unsaturated solutions of sodium chloride as reference source of water activity at various temperatures. **Journal of Food Science**, (49), p.1486-1488, (1984).

CREUS, A. Humedad en sólidos. Marcombo A (ed) **Instrumentación industrial**, 6th edn. Boixareu Editores, Colombia, p. 327-329, (1998a).

CREUS, A. Concentración de gases. Marcombo A (ed) **Instrumentación industrial**, 6th edn. Boixareu Editores, Colômbia, p. 358-363, (1998b).

CREUS, A. Otras variables. Marcombo A (ed) **Instrumentación industrial**, 6th edn. Boixareu Editores, Colômbia, p. 301-363, (1998c).

DALSENTER, F. D. H.; VICCINI, G.; BARGA, M. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process biochemistry**, (40), p. 901-807, (2005).

DALSENTER, F.D.H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em fermentação no estado sólido**. Tese (Doutorado em Ciências (Bioquímica)), Universidade Federal do Paraná, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: David Alexander Mitchell, (2005).

DURAND, A.; CHEREAU, D. A new pilot reactor for solid-state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. **Biotechnology and Bioengineering** (31), p. 476-486, (1988).

FERNÁNDEZ, M.; ANANÍAS, J.; SOLAR, I.; PEREZ, R.; CHANG, L.; AGOSIN, E. Advances in the development of a control system for a solid substrate pilot bioreactor. Roussos S, Lon-sane BK, Raimbault M, Viniegra-González G (eds) **Advances in Solid State Fermentation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p 155-168, (1997).

FUNG, C.J.; MITCHELL, D.A. Baffles increase performance of solid-state fermentation in rotating drums. **Biotechnology Techniques** (9), p. 295-298, (1995).

GLENN, D.R.; ROGERS, P.L. A solid substrate process for an animal feed product: Studies on fungal strain improvement. **Australian J Biotechnol** 2(1), p. 50-57, (1988).

HARDIN, M.T.; MITCHELL, D.A. Recent developments in the design, operation and modelling of bioreactors for solid-state fermentation. **Recent Research Developments in Fermentation and Bioengineering**, (1), p. 205-222. Edited by F Kaowai & K, Sasaki, Research Signpost: Trivandrum, (1998).

HARDIN, M.T; HOWES, T; MITCHELL, D.A. Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering** (74), p. 145-153, (2001).

HARDIN, MT; HOWES, T; MITCHELL. D.A. Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors. **Journal of Biotechnology** 97(1), p. 89-101, (2002).

HIMMELBLAU, D. M. **Basic Principles and Calculations in Chemical Engineering**, 6th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, (1996).

IKASARI, L.; MITCHELL, D.A.; STUART, D.M. Response of *Rhizopus oligosporus* to temporal temperature profiles in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering** 64 (6), p. 722-728, (1999).

KAMINSKI, R.K.; RAZAQ, M.; LIPTÁK, B.G. Analytical instrumentation (oxygen in gases). Lipták BG (ed) **Instrument engineers' handbook: process measurement and analysis**. Chilton Book Company, Radnor, Pennsylvania, p. 1116-1123, (1995).

KHANAHMADI, M.; MITCHELL, D.A.; BEHESHTI, M.; ROOSTAAZAD, R.; SANCHEZ, L.R. Continuous solid state fermentation as affected by substrate flow pattern. **Chemical Engineering Science**, (61), p.2675 – 2687, (2006).

KHANAHMADI, M.; ROOSTAAZAD, R.; MITCHELL, D. A.; MIRANZADEH, M.; BOZORGMEHRI, R.; SAFEKORDI, A. Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, 61(16), p. 5654-5663, (2006).

KOSSEN, N.W.F.; OOSTERHUIS, N.M.G. Modelling and scaling up of bioreactors. **Biotechnology**, (2.), Ed. H.J. REHM & G. REED, Verlag Chemie. Weinheim, p. 571-605, (1981).

LOMAS, D.J.; LIPTÁK, G.B. Flow measurement (application and selection). Lipták BG (ed) **Instrument engineers' handbook: process measurement and analysis**. Chilton Book Company, Radnor, Pennsylvania, p. 76-87, (1995).

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochem.** (27), p. 259–273, (1992).

MARQUES, B. C. **Estudo de sistemas de fermentação em estado sólido em escala piloto**. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade Federal do Paraná, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: David Alexander Mitchell, (2005).

MARQUES, B. C; BARGA, M. C.; BALMANT, W.; LUZ JR, L. F. L.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. A model of the effect of the microbial biomass on the isotherm of the fermenting solids in solid state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, (44), p. 457-463, (2006).

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, (68), p. 61-138, (2000a).

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, (8), p. 183-216, Edited by EL-GEWELY, M,R, (2002).

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K.; DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DESGRANGES, C.; CROOKE, P.S.; HONG, K.; TANNER, R.D.; MALANEY, G.W. General Principles of Reactor design and operation for SSC. Doelle HW, Mitchell DA, Rolz CE (eds), **Solid substrate cultivation**. Elsevier Applied Science, London, p. 115-139, (1992).

MITCHELL, D.A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Biochemistry** 35(1-2), p. 167-178, (1999).

MITCHELL, D.A.; TONGTA, A; STUART, D.M; KRIEGER, N. The potential for establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, 80(1), p. 114-122, (2002a).

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the *zymotis* packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, 68 (2), p.127-135, (2000).

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, 13 (2-3), p. 137-147, (2002).

MITCHELL, D.A.;KRIEGER, N; BEROVIC, M. Solid **State Fermentation Bioreactors: Fundamental of Design and Operation**. Springer, 1^a ed., (2006).

MONTAGUE, G. **Monitoring and control of fermenters**. Institution of Chemical Engineering, UK, (1997).

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENDERDY, R.P. **The Filamentous Fungus**. Vol 4 , Chap. 5 Oxford and IBH publisher, New Delhi, India, (1983).

MORIN, L. Realizing the potential of bioherbicides. **Plant Production**, (7), p. 143-148, (1992).

NAGEL, F.J.I; TRAMPER, J; BAKKER, M.S.N; RINZEMA, A. Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, (72), p. 231-243, (2001).

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA T.; ATTHASAMPUNNA, P.; TAGUCHI, H. Control of Water Content in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **J. Ferment. Technol.**, (62), p. 453-459, (1984).

NOPHARATANA, M. **Microscale studies of fungal growth in solid state fermentation**. Tese (doctor of philosophy in chemical engineering). Thailand, University of Queensland, (1999).

OOIJKAAS, L.P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R.M. Biomass estimation of *Coniothyrium mini-tans* in solid-state fermentation. **Enzyme Microb Technol**, (22), p. 480-486, (1998).

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I – **Bioprocesses and products**. **Process Biochemistry**, 35 (10), p. 1153-1169, (2000).

PEÑA Y LILLO, M.; PÉREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E.; LATRILLE, E. Indirect measurement of water content in an aseptic solid substrate cultivation pilot-scale biorreactor. **Biotech. and Bioeng.**, 76 (1), (2001).

PEÑA Y LILLO, M.; PEREZ-CORREA, R.; LATRILLE, E.; FERNANDEZ, M.; ACUNA, G.; AGOSIN, E. Data processing for solid-substrate cultivation bioreactors. **Bioprocess Engineering**, (22), p. 291-297, (2000).

RAIMBAULT, M. **General and Microbial aspects of solid substrate fermentation**, 1 (3), Universidade católica de valparaíso – Chile, (1998).

RAJAGOPALAN, S.; MODAK, J.M. Modeling of heat and mass transfer for solid state fermentation process in tray bioreactor. **Bioprocess Engineering** 13 (3), p.161-169, (1995).

REID, R.C.; PRAUSNITZ, J.M.; SHERWOOD, T.K. **The properties of gases and liquids**. 3rd edition. New York: McGraw-Hill 688, (1977).

RIBEIRO, D. M.; CORRÊA, P. C.; RESENDE, O.; BOTELHO, F. M. Propriedades Térmicas de Grãos de Trigo: Determinação e Modelagem. **Cienc. Agrotec.**, 31 (2), Lavras, (2007).

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; PREBOIS, J-P.; LONSANE, B.K. Zymotis, a large scale solid state fermenter. **Appl Biochem Biotechnol**, (42), p. 37-52, (1993).

RYOO, D. **On-line estimation and control in solid substrate fermentation**. PhD thesis. Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, (1990).

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D.A. Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** (64), p. 253-260, (1995).

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D.A. Validation of a model describing 2-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, 60 (6), p. 739 – 749, (1998).

SARGANTANIS, J.; KARIM, M.N; MURPHY, V.G.; RYOO, D.; TENDERDY, R.P. Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, (42), p. 149-158, (1993).

SATO, K.; NAGATANI, M.; NAKAMURA, K.; SATO, S. Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. **J Ferment Technol**, (61), p. 623-629, (1983).

SATO, K.; YOSHIZAWA, K. Growth and growth estimation of *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state ethanol fermentation. **J Ferment Technol**, (66), p. 667-673, (1988).

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B.K.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a column fermentor. **Appl Microbiol Biotechnol**, 37(5), p. 580-582, (1992).

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; TREJO-HERNÁNDEZ, M.R.; LONSANE, B.K.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; DUFOUR, D.; RAIMBAULT, M. On-line automated monitoring and control system for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentation. **Process Biochem**, (29), p. 13-24, (1994).

SAUCEDO-CASTENEDA, G.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; BACQUET, G.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, (35), p. 802-808, (1990).

SCHUTYSER, M.A.I.; WEBER, F.J.; BRIELS, W.J.; RINZEMA, A.; BOOM, R.M. Heat and water transfer in a rotating drum containing solid substrate particles. **Biotechnology and Bioengineering**, 82 (5), p. 552-563, (2003).

SCHUTYSER, M.A.I.; PADDING, J.T.; WEBER, F.J.; BRIELS, W.J.; RINZEMA, A.; BOOM, R. Discrete Particle Simulations Predicting Mixing Behavior of Solid Substrate Particles in a Rotating Drum Fermenter. **Biotechnology and Bioengineering** (75), p. 666-675, (2001).

SCHUTYSER, M.A.I.; WEBER, F.J.; BRIELS, W.J.; BOOM, R.; RINZEMA, A. Three-dimensional simulation of grain mixing in three different rotating drum designs for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, (79), p.284-294, (2002).

SEEBORG, D. E.; EDGAR, T. S.; MELLICHAMP, D. A. **Process Dynamics and Control**. Willey, New York, 2^a ed. (2004).

SIEV, R.; ARANT, J.B.; LIPTÁK, G.B. Flow measurement (laminar flow-meters). Lipták BG (ed) **Instrument engineers' handbook: process measurement and analysis**. Chilton Book Company, Radnor, Pennsylvania, p. 104.109, (1995).

SMITS, J.P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; SCHLOSSER, E.E.; KNOL, W. Accurate determination of process variables in a solid-state fermentation system. **Process Biochem.**, (31), p. 669-678, (1996).

SMITS, J.P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; VAN SONSBECK, H.M.; HAGE, J.C.; KAYNAK, A.; KNOL, W. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**, (22), p. 50-57, (1998).

STUART, D.M.; MITCHELL D.A. Mathematical model of heat transfer during solid-state fermentation in well-mixed rotating drum bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 78 (11), p. 1180-1192, (2003).

SWEAT, V.E. **Thermal properties of foods**. Engineering properties of foods. Rao, M.A, Rizvi, S.S, editors. New York: Marcel Dekker, p. 49-132, (1986).

VICINI, G.; MITCHELL, D.A.; BOIT, S.D.; GERN, J.C.; ROSA, A.S da.; COSTA, R.M.; DALSENTER, F.D.H.; VON MEIEN O.F.; KRIEGER, N. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology** (39), p. 271-294, (2001).

VILLEGAS, E.; AUBAGUE, S.; ALCANTARA, L.; AURIA, R.; REVAH, S. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. **Biotech Adv.**, (11), p. 387-397, (1993).

VON MEIEN, O.F.; MITCHELL, D.A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering** 79(4), p. 416-428, (2002).

WEBER, F.J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, (65), p. 447-458, (1999).

WEBER, F.J; OOSTRA, J; TRAMPER, J; RINZEMA, A. Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, (77), p. 381-393, (2002).

ANEXO I

POP 01-01	Equipamento – Autoclave AC-01	Informações
<p>Características Técnicas – Autoclave PHOENIX Modelo AV 300 / 220V</p> <p>Tensão de Alimentação e Potência</p> <ul style="list-style-type: none"> • Voltagem (volts) Vca(~) 100 +/-10% • Frequência Hertz (Hz) 50/60 • Potência Watts (W) 8000 • Corrente I (A) 37 <p>Dimensões, Capacidade e Peso</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dimensões Internas (cm) 60 x 110 • Dimensões Externas (cm) 79 x 85 x 120 • Capacidade (litros) 300 • Peso Líquido (Kg) 230 <p>Resistência (Resistência elétrica de imersão)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Potência Watts (W) 4000 • Tensão (Volts) Vca (~) 220V <p>Categoria do Vaso</p> <ul style="list-style-type: none"> • MPTA = 1,6 Kg/cm² (Máxima Pressão de Trabalho Admissível); • Pressão de Operação = 1 a 1,5 Kg/cm²; • Pressão Hidrostática = 3 Kg/cm²; • Categoria do Vaso de Pressão “V” (Base Grupo de Potencial de Risco); • Classe de Fluido “C” (Vapor de Água). 		
<p>Conjuntos, Peças e Acessórios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resistências: As resistências são do tipo tubular de imersão com fácil acesso para manutenção e limpeza. • Manômetro – Código: O manômetro possui duas escalas, sendo uma em pressão (kgf/cm²) e outra correspondente em temperatura (°C). • Conjunto da Tampa: Confeccionada em liga de bronze fundido, recebe internamente um tratamento de estanho, e externamente polida e envernizada. Sobre a tampa é acoplado todo o conjunto da válvula de processo, juntamente com o manômetro. Sua abertura é realizada através de um pedal situado na parte inferior frontal, que levanta a tampa permitindo girá-la para abri-la. • Manipulo Baquelite: Os manipuladores foram desenvolvidos e são construídos em latão e revestidos em baquelite (isolante de calor), proporcionando segurança e melhor conforto ao operador. 		

Precauções, Restrições e Advertências

- Verifique se a rede ao qual o equipamento será conectado possui característica para suportar as condições elétricas do equipamento.
- O cabo de alimentação deve ser conectado a uma rede aterrada, fixada permanentemente na parede ou bancada. Nunca faça uso de extensões.
- Nunca ligue a autoclave sem água, para evitar a queima das resistências, já que se trata de uma resistência do tipo de imersão, correndo o risco de ser danificada.
- O equipamento trabalha com água em ebulição, assim, todo o conjunto da tampa adquire em funcionamento, temperaturas da ordem de 100 °C, que podem provocar queimaduras, sendo necessários em seu manuseio utensílios de proteção, tais como luvas de trabalho.
- Este autoclave trabalha por princípio de esterilização a vapor, não possuindo ciclos de secagem, assim ao final de cada ciclo as provas se apresentarão úmidas.

Instalação do Equipamento

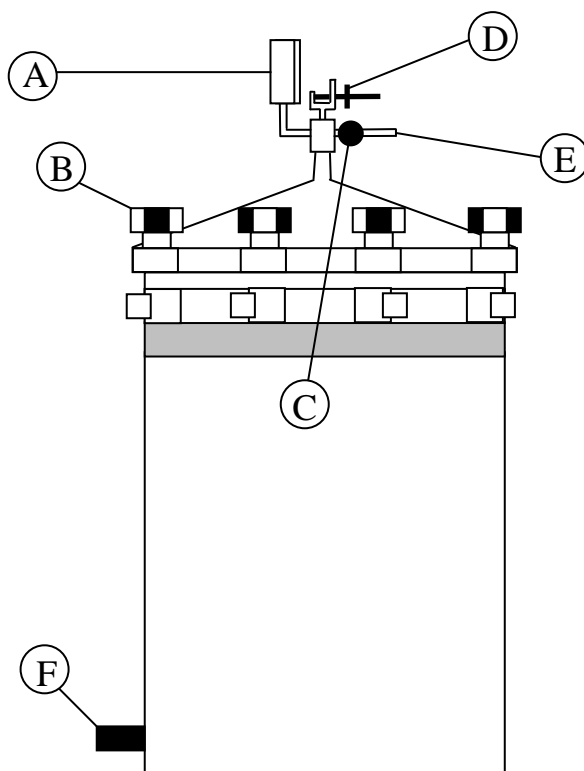
O equipamento deverá ser instalado em ambiente aberto, isto é, não deverá ser confinado entre paredes. O equipamento deverá estar afastado, no mínimo, 50 centímetros das paredes e outros equipamentos, a rede elétrica deverá estar perfeitamente dimensionada para suportar os requisitos elétricos da autoclave.

As autoclaves que não possuem o plug para tomada industrial devem ser ligadas da seguinte maneira:

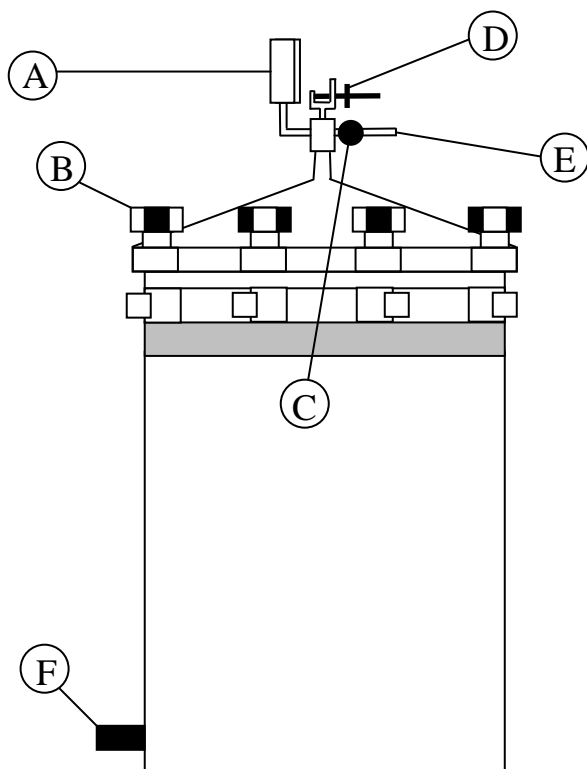
- Fio verde – deverá ser ligado em um terra eficiente
- Os outros dois fios restantes deverão ser ligados a fase / fase (220V) ou fase / neutro (110V).
-

IMPORTANTE: em algumas regiões, cada fase já possui tensão em 220V. Nestes casos, a ligação do aparelho (somente 220V) deverá ser feita ligando-se a lâmina (fio) terra, um borne (fio) na fase e outra no neutro.

POP 01-02	Equipamento – Autoclave AC-01	Procedimento - Abertura
Materiais	Luvas de proteção	Guarda-pó
	Balde com água	
<p>1) Verificar a posição da chave no painel de controle – DESLIGA</p> <p>2) Verificar a posição da chave na autoclave – DESLIGA</p> <p>3) Verificar a pressão no manômetro (A), somente abrir quando o manômetro indicar 0 kgf/cm² ou 100 °C.</p> <p>ATENÇÃO: É obrigatório abrir a válvula (C) de escape quando atingir a temperatura de 100°C, pois com o resfriamento da autoclave com está válvula fechada pode acarretar danos no vaso de pressão devido a formação de vácuo.</p> <p>4) Abrir a válvula de escape (C) ao lado do manômetro até a exaustão completa do vapor e despressurizarão do equipamento.</p> <p>5) Abrir a autoclave, abrindo as garras (manípulas) (B) por igual e em forma de cruz</p> <p>6) Levantar a tampa da autoclave pisando no pedal (F) até que a mesma esteja toda aberta. Durante a abertura manter o pé no pedal para que a tampa fique levantada.</p> <p>7) Retirar os cestos de inox com auxílio de luvas de proteção. Tenha cuidado nesta etapa devido os materiais estarem quentes.</p> <p>8) Verificar o nível da água. O nível deve estar próximo ao descanso do cesto.</p>		



POP 01-03	Equipamento – Autoclave AC-01	Procedimento – Fechamento/Esterilização
Materiais	Luvras de proteção	Guarda-pó
	Balde com água	
<ol style="list-style-type: none"> 1) Verificar o nível da água. O nível deve estar próximo ao descanso do cesto. 2) Colocar o material a ser esterilizado nos cestos de inox e depois colocar dentro da autoclave. 3) Fechar a autoclave, sempre pisando no pedal (F) para manter a tampa levantada. 4) Colocar a tampa na posição correta e apertar as garras (manipulas) (B) em forma de cruz. 5) Abrir a válvula de escape de vapor (C). 6) Verificar a posição da chave no painel de controle – LIGADA 7) Colocar a posição da chave na autoclave – LIGADA (MÁX) 8) Esperar a total eliminação do ar interno (saída constante de vapor) através do bico (E), e em seguida fechar a válvula (C). 9) Aguardar até atingir a pressão e temperatura de esterilização (121 °C), em seguida colocar a chave na posição média (MED) para manter a temperatura. (Tempo padrão de esterilização á 121 °C é de 20 minutos). 10) Após o tempo de esterilização colocar a chave na posição desligada (DESL.) 11) Seguir o procedimento para abertura da autoclave. POP – Abertura da autoclave 		

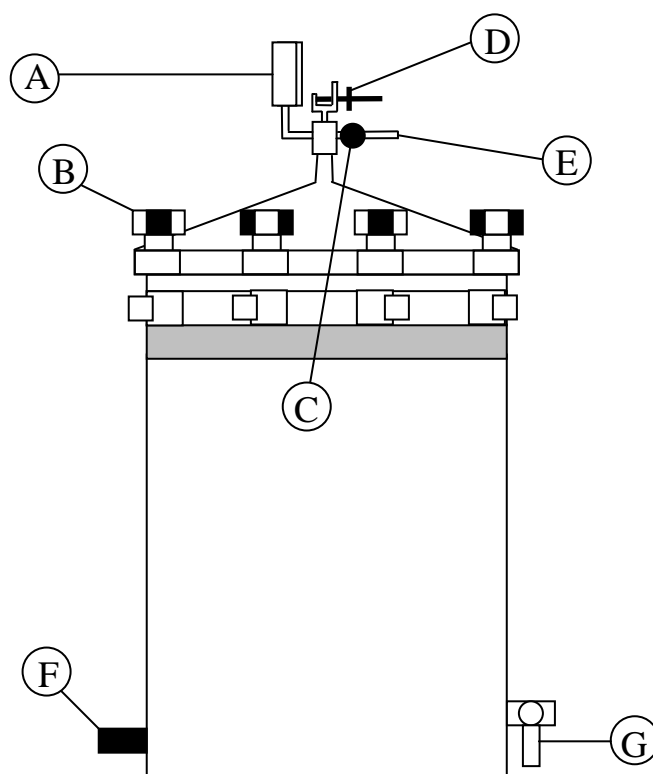


POP 01-04	Equipamento – Autoclave AC-01	Procedimento - Limpeza												
Materiais	Luvas de proteção	Balde – Pano macio												
	Guarda-pó	Sabão Neutro												
<ol style="list-style-type: none"> 1) Verificar a posição da chave no painel de controle – DESLIGA 2) Verificar a posição da chave na autoclave – DESLIGA 3) Verificar a pressão no manômetro (A), somente abrir quando o manômetro indicar 0 kgf/cm² ou 100 °C. 4) Abrir a válvula de escape (C) ao lado do manômetro até a exaustão completa do vapor. 5) Abrir a autoclave, abrindo as garras(manípuas) (B) por igual e em forma de cruz 6) Levantar a tampa da autoclave pisando no pedal (F) até que a mesma esteja toda aberta. Durante a abertura manter o pé no pedal para que a tampa fique levantada. 7) Certifique-se que o equipamento encontra-se desligado há um certo tempo para garantir que as duas resistências encontram-se frias. 8) Retirar os cestos de inox com auxílio de luvas de proteção. Tenha cuidado nesta etapa devido os materiais estarem quentes. 9) Drenar toda água existente em seu anterior abrindo a válvula (G). Coletar a água com o auxílio de um balde. 10) Limpar a câmara interna e as resistências com água morna e sabão neutro, tomando cuidado para não danificar as resistências, utilizar um pano macio e que não solte fiapos. 11) Eliminar eventuais sujeiras no interior da câmara, de maneira alguma limpar o equipamento e partes do aço inoxidável com ácidos e solventes que contenham cloro ou soluções de sal. 12) Cuidadosamente recoloque as partes internas da autoclave. Recomenda-se realizar a limpeza constantemente, para remover as impurezas que ficam incrustadas nas resistências, o que faz o equipamento perder sua eficiência normal. 13) Sempre utilize a autoclave com água limpa, isto assegura uma apropriada operação. <p>Atenção: Não utilize agente abrasivo ou alvejante para a limpeza da câmara e cestos. Nunca utilize escova de aço, palha de aço e outros similares, estes materiais podem danificar a superfície metálica da câmara e seus componentes.</p>														
Quadro de Manutenção <table border="1"> <thead> <tr> <th>Intervenção</th><th>Prazo</th><th>Executante</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Limpeza Guarnição da Tampa</td><td>Diário</td><td>Usuário</td></tr> <tr> <td>Limpeza Câmara e Cestos</td><td>Semanalmente</td><td>Usuário</td></tr> <tr> <td>Válvula Controladora</td><td>Mensalmente</td><td>Usuário/Executante</td></tr> </tbody> </table> <p>Limpeza da Guarnição da Tampa – limpe a guarnição da tampa e superfícies adjacentes com um pano úmido. Examine se há algum dano na guarnição de silicone para assegurar uma boa vedação.</p> <p>Limpeza da Câmara e Cestos – a câmara de esterilização e cestos devem ser limpos semanalmente. Primeiramente drene totalmente a água da câmara, lave o seu interior e o cesto com água morna e sabão neutro, ou outro produto específico para o fim, seguindo as</p>			Intervenção	Prazo	Executante	Limpeza Guarnição da Tampa	Diário	Usuário	Limpeza Câmara e Cestos	Semanalmente	Usuário	Válvula Controladora	Mensalmente	Usuário/Executante
Intervenção	Prazo	Executante												
Limpeza Guarnição da Tampa	Diário	Usuário												
Limpeza Câmara e Cestos	Semanalmente	Usuário												
Válvula Controladora	Mensalmente	Usuário/Executante												

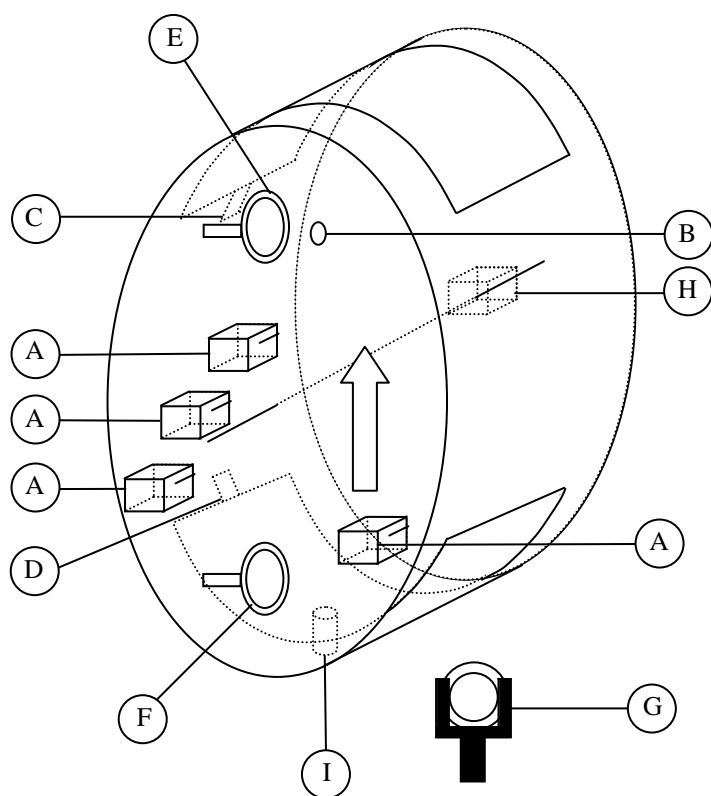
instruções de limpeza.

Verificação da Válvula Controladora – a válvula controladora de pressão deve ser verificada a cada mês por uma pessoa qualificada para se ter certeza que a válvula esteja funcionando perfeitamente.

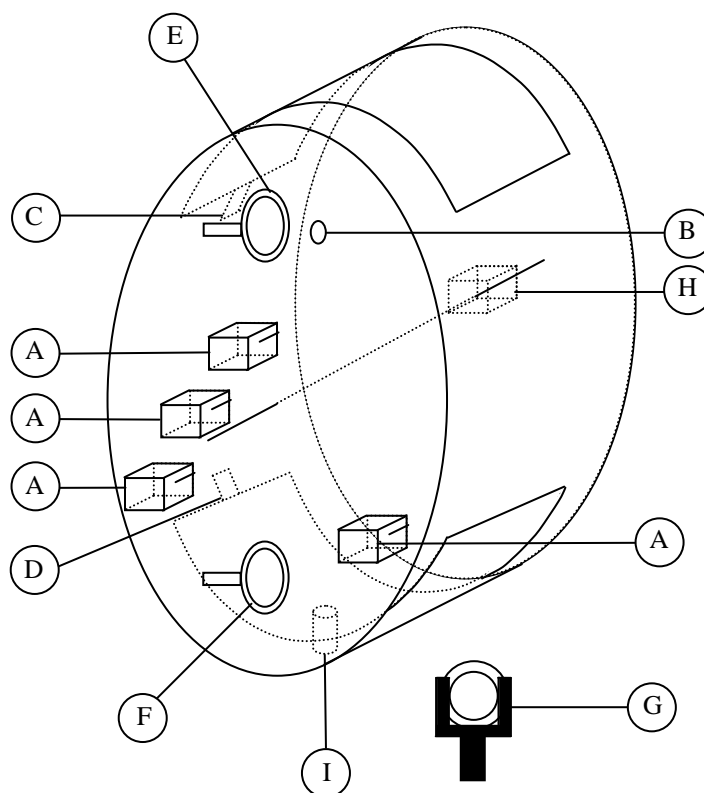
Com o correto fechamento da válvula, a pressão interna da câmara deverá subir novamente até a faixa de controle estipulada de 1,0 Kgf/cm². Repita este procedimento 3 vezes, se a válvula controladora não funcionar corretamente, deverá ser substituída.



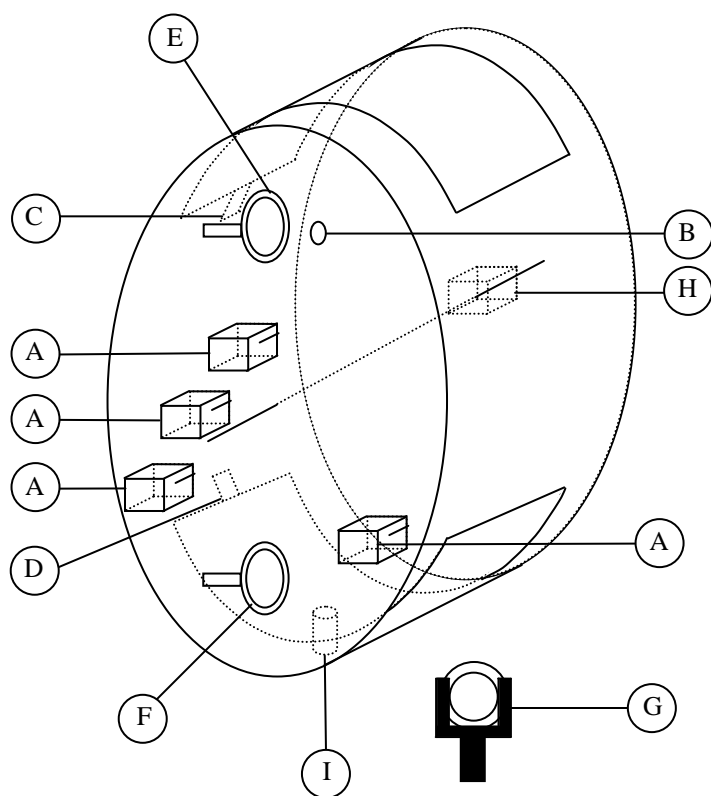
POP 02-01	Equipamento – Biorreator BIO-02	Procedimento – Abertura
Materiais	Guarda-pó	Luvras de proteção
	Óculos de proteção	
<ol style="list-style-type: none"> 1) Desligar o biorreator no painel de controle – Posição DESLIGA 2) Desligar soprador no painel de controle – posição DESLIGA 3) Parar o biorreator na posição indicada na figura abaixo. 4) Fechar as válvulas de entrada (E) e saída (F) de ar. 5) Fechar o registro de água e de ar comprimido utilizados para o sistema de umidificação (borrifamento de água) (SB-03) 6) Abrir a alavanca (C). Atenção ao abrir. 		



POP 02-02	Equipamento – Biorreator BIO-02	Procedimento – Agitação
Materiais	Guarda-pó	
<ol style="list-style-type: none"> 1) Fechar o registro de água e de ar comprimido utilizados para o sistema de umidificação (borrifamento de água) (SB-03) 2) Desconectar a mangueira do sistema de borrifamento (B). 3) Desligar soprador no painel de controle – posição DESLIGA 4) Fechar as válvulas de entrada (E) e saída (F) de ar. 5) Desconectar as mangueiras de ar ligadas às válvulas (E) e (F). 6) Colocar as mangueiras de ar nos suportes (G) apropriadamente. 7) Desconectar todos os cabos dos termopares (A) e colocá-los em local apropriado. 8) Fechar as travas das tampas (C) e (D). 9) Ligar o biorreator no painel de controle – posição LIGA. 10) Justar a frequência de agitação no inversor de frequência do motor (H). A frequência de rotação deve ser superior a 20 rpm. Caso o motor tenha dificuldade em agitar o corpo do biorreator, pode-se ajudar manualmente no mesmo sentido do motor. <p>Atenção: Caso o biorreator não agite verificar se há uma luz vermelha acesa no painel de controle. Caso isso ocorra verificar se as mangueiras de ar (E) e (F) estão posicionadas corretamente no suporte (G) ou chamar o técnico responsável.</p>		

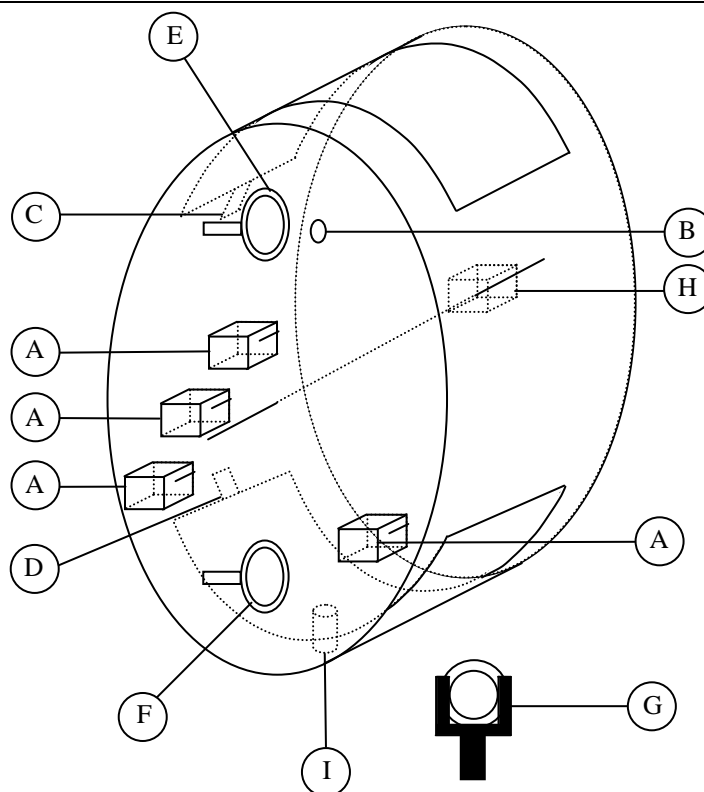


POP 02-03	Equipamento – Biorreator BIO-02	Procedimento – Operação Estática
Materiais	Guarda-pó	Luvas de proteção
	Óculos de proteção	
<ol style="list-style-type: none"> 1) Desligar o biorreator no painel de controle – Posição DESLIGA 2) Conectar as mangueiras de ar em (E) e (F) e abrir as respectivas válvulas. 3) Conectar a mangueira de engate rápido em (B) do sistema de umidificação (SB-03). 4) Conectar os cabos dos termopares em (A). 5) Ligar o computador e executar programa Bio2phase (Labview) 6) Ligar o soprador no painel de controle – posição LIGA. 		



POP 02-04	Equipamento – Biorreator BIO-02	Procedimento – Limpeza/Esterilização
Materiais	Guarda-pó	Luvas de proteção
	Óculos de proteção	Máscara de proteção

- 1) Desligar o biorreator no painel de controle – Posição DESLIGA
- 2) Desligar soprador no painel de controle – posição DESLIGA
- 3) Parar o biorreator na posição indicada na figura abaixo.
- 4) Fechar as válvulas de entrada (E) e saída (F) de ar.
- 5) Fechar o válvula de água e de ar comprimido utilizados para o sistema de umidificação (borrifamento de água) (SB-03).
- 6) Abrir a alavanca (C). Atenção ao abrir.
- 7) Caso haja material dentro do biorreator removê-lo manualmente.
- 8) Abrir a válvula (I), para escoar pelo dreno no fundo do biorreator.
- 9) Abrir a alavanca (D). Atenção ao abrir.
- 10) Primeiramente limpar com uma solução com sabão neutro. Aguardar em torno de 10 min e enxaguar.
- 11) Limpar a grade que se encontra na parte inferior adequadamente, se for necessário remover a grade da base para uma limpeza apropriada.
- 12) Limpar o restante do equipamento com uma solução de álcool 70%.
- 13) Fechar a alavanca (C) e (D). Manter as válvulas (E), (F) e (I) abertas.
- 14) Colocar a mangueira que está conectada na saída da autoclave e colocar na entrada por baixo do biorreator, conexão (F). Deve-se colocar água suficiente na autoclave para que durante o processo de esterilização a água não acabe o que pode queimar a resistência da mesma
- 15) Após 1 hora de esterilização desligar a autoclave, desconectar a mangueira de vapor. Manter as válvulas abertas até o resfriamento do biorreator.



POP 03-01	Equipamento – Filtro de ar do compressor SB-03	Informações
Características Técnicas		
Conexão	RC 1/2”	
Temperatura de Trabalho	0 a + 52°C	
Pressão de Entrada	0 a 12 bar (0 a 175 psi)	
Pressão de Regulagem	0,14 a 8,5 bar (2 a 125 psi)	
Capacidade do Copo	0,12 L (Filtro/Regulador)	0,08 L (Lubrificador)
Elemento de Filtragem	40 micra	
Peso	0,3 kg (Filtro/Regulador)	0,2 kg (Lubrificador)
Materiais		
Corpo	Termoplástico Poliamida	
Copo	Termoplástico Policarbonato	
Anel de Fixação do Copo	Termoplástico Poliamida	
Vedações	Borracha Nitrílica	
Manopla de Regulagem	Termoplástico Poliacetal	
Cuidados		
<ul style="list-style-type: none">• Não devem ser instalados em locais onde possam estar em contato direto com raios solares, sujeitos a impactos e temperaturas fora dos limites especificados;• Alguns produtos químicos podem causar danos aos copos de policarbonato, os quais não devem entrar em contato com hidrocarbonetos aromáticos e halogenados, álcoois, compostos orgânicos clorados, produtos de caráter básico orgânicos e inorgânicos, aminas e cetonas;• Deve-se drenar constantemente o condensado, para que o mesmo não atinja a base do elemento filtrante;• Ao notar qualquer alteração no copo de policarbonato, tais como trincas, substitua-o imediatamente.		
Elementos não Compatíveis ao Policarbonato		
Acetona	Anidrido	Fenol
Acético Ozônio	Anilina	Gasolina
Ácido Acético	Benzeno	Hidróxido de Amônia
Ácido Fórmico	Ciclo Hexanol	Hidróxido de Sódio
Ácido Hidroclórico	Carbonato de Amônia	Metiletilcetona
Ácido Nítrico	Clorobenzeno	Óleo para Freio Hidráulico
Ácido Sulfúrico	Cloroetileno	Percloroetileno
Ácido Etílico	Clorofórmio	Terpentina
Ácido Isopropílico	Cresol	Tetracloroeto de Carbono
Ácido Metílico	Diamina	Thinner
Aldeído	Éter Etílico	Tolueno
Amônia	Freon	Xileno

POP 03-02	Equipamento – Filtro de ar do compressor SB-03	Procedimento – Manutenção
Materiais	Guarda-pó	
	Óculos de Proteção	
<p>Instalação</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desligar o fornecimento de ar e despressurizar todas as linhas ligadas ao local onde o produto será instalado. • Desligar a energia elétrica antes de iniciar a instalação, caso o circuito seja eletropneumático. • Instalar o produto em um local de fácil acesso para facilitar a manutenção, observando o sentido do fluxo conforme indicação no corpo. • Usar o mínimo de tubulação para evitar perda e carga desnecessária. • A tubulação deve estar isenta de sujeira, aparas ou rebarbas. • Usar veda rosca somente nas roscas macho e em pequena quantidade. • Proteger o produto contra exposição à temperatura extrema, sujeira e umidade, operando sempre dentro das especificações técnicas. Isto proporcionará maior vida útil ao produto. • Após feita a instalação do produto, as fontes de ar e energia elétrica deverão ser ligadas e o produto testado quanto ao seu funcionamento. Caso o produto não funcione devidamente, não colocá-lo em uso. • Os avisos e etiquetas de identificação não deverão ser cobertos por tinta. • O filtro/regulador e o Lubrificador devem sempre ser instalados verticalmente, com o copo na posição inferior. 		
<p>Manutenção</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desligar o fornecimento de ar e despressurizar todas as linhas ligadas ao local onde o produto será instalado. • Desligar a energia elétrica antes de iniciar a instalação, caso o circuito seja eletropneumático. • Retirar o produto do equipamento e/ou sistema pneumático e remover a sujeira do mesmo antes de iniciar a manutenção. 		
<p>Manutenção do sistema de filtragem</p> <p>Nota: A referência para os sentidos horário e anti-horário é a vista de cima para baixo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para a desmontagem do copo (02), remover o colar de fixação (01) girando-o no sentido horário. • Desencaixar o copo (02) do corpo do filtro (03). • Remover a base do elemento (04) girando-a no sentido horário. • Remover o elemento filtrante (05). • Remover a haste de fixação do elemento (08). • Remover o defletor (06). • Remover o anel O´ring (07) fixado no corpo do filtro. • Lavar os componentes utilizando sabão neutro e secá-los. 		

- Avaliar as condições do elemento filtrante (05).
- Montar o anel O´ring (07) no alojamento interno do corpo do filtro.
- Montar o defletor (06).
- Montar o tirante de fixação do elemento (08).
- Montar o elemento filtrante (05). Atenção: O elemento filtrante (05) possui um rebaixo em um dos seus lados. Este rebaixo deve ser montado para cima.
- Montar a base do elemento (04), girando-o no sentido anti-horário.
- Encaixar o copo (02) no corpo do filtro/regulador (03).
- Montar o colar de fixação (01), girando-o no sentido anti-horário.

Manutenção do sistema de regulação

Nota: A referência para os sentidos horário e anti-horário é a vista de cima para baixo.

Desmontagem do regulador

- O regulador é formado por dois conjuntos principais: o conjunto da tampa (09) e o conjunto do corpo do regulador (03).
- Para proceder a manutenção do regulador, é necessária a desmontagem dos dois conjuntos principais.
- Remover o colar de fixação (10) girando no sentido anti-horário até soltá-lo completamente do regulador. Este procedimento irá separar os dois conjuntos principais do regulador.
- Os dois conjuntos principais devem ser desmontados e montados separadamente seguindo as orientações abaixo.

Desmontagem do conjunto da tampa (09)

- Girar a manopla (11) no sentido anti-horário até o final do curso para soltar o conjunto do diafragma (12), o conjunto do parafuso de regulação (13), o anel de nylon (20) e a mola de regulação (14).
- Todos os conjuntos que fazem parte do conjunto tampa devem estar soltos.

Desmontagem do conjunto do corpo do regulador (03)

- Remover o conjunto do assento (15) e o conjunto da haste (16) alojados no corpo do regulador (03).
- Remover o O´ring do corpo do regulador (17) e o O´ring do conjunto do assento (18).
Dica: Para remover o conjunto do assento (15) e o conjunto haste (16) do corpo do regulador, inserir um jato de ar comprimido a baixa pressão (máx. 2 bar) na entrada do produto.
- Remover o conjunto da haste (16) do conjunto do assento (15).
- Remova a mola de retorno (19) do fundo do regulador.
- Verificar as condições dos componentes, caso algum componente apresentar avaria, substituí-lo.

Montagem do conjunto do corpo do regulador (03)

- Lavar os componentes com água e sabão neutro e secá-los.

- Lubrificar o O´ring do corpo do regulador (17) e o O´ring do conjunto do assento (18) com uma fina camada de graxa.
- Colocar a mola de retorno (19) do fundo do regulador.
- Montar o O´ring (17) que fica entre o conjunto do assento (15) e o corpo do regulador (03).
- Montar o conjunto da haste (16) no conjunto do assento (15) e inserir no corpo do regulador (03) sobre a mola de retorno (19).
- Não pressionar o conjunto do assento (15) contra a mola de retorno (19) no fundo do regulador, para não provocar o deslocamento dos O´rings, ocasionando um possível vazamento no regulador após sua montagem.

Montagem do conjunto da tampa (09)

- Montar o anel de Nylon (20) no conjunto do parafuso de regulagem (13).
- Encaixar o conjunto do parafuso de regulagem (13) na tampa (09) e montar a manopla (11).
- Virar o conjunto com a manopla (11) para baixo.
- Colocar a mola de regulagem (14).
- Girar a manopla (11) no sentido horário para que a mola de regulagem (14) seja recolhida para dentro do conjunto da tampa (09).
- Montar o conjunto diafragma (12) com o cone do conjunto voltado para o lado da manopla (11).
- O conjunto diafragma (12) deverá estar bem encaixado no conjunto da tampa (09).

Montagem do regulador

- Montar o conjunto da tampa (09) sobre o conjunto do corpo do regulador (03).
- Colocar o colar de fixação (10) a manopla (11).
- Girar no sentido horário para travar os dois conjuntos que formam o regulador.
- Reinstalar o regulador ao equipamento e/ou sistema pneumático.

Manutenção do sistema de lubrificação

Nota: A referência para os sentidos horário e anti-horário é a vista de cima para baixo.

Desmontagem do conjunto do corpo (36)

- Remover o colar de fixação (29) girando no sentido horário.
- Remover o copo (30).
- Remover o O´ring do copo (28).
- Remover o tubo pescador (31) do corpo (36) do lubrificador.
- Remover os parafusos de fixação (27) do suporte do venturi (26).
- Remover o suporte do venturi (26).
- Remover a membrana (32).
- Remover a mola (33) e a esfera que fica acima desta mola tomando cuidado pois ambas ficarão soltas após a retirada da membrana (32).
- Remover a vedação do suporte do venturi (35).
- Remover o O´ring do venturi (34) do fundo do corpo (36) do lubrificador.

Desmontagem do conjunto gotejador (22) e do plug despressurizador (24)

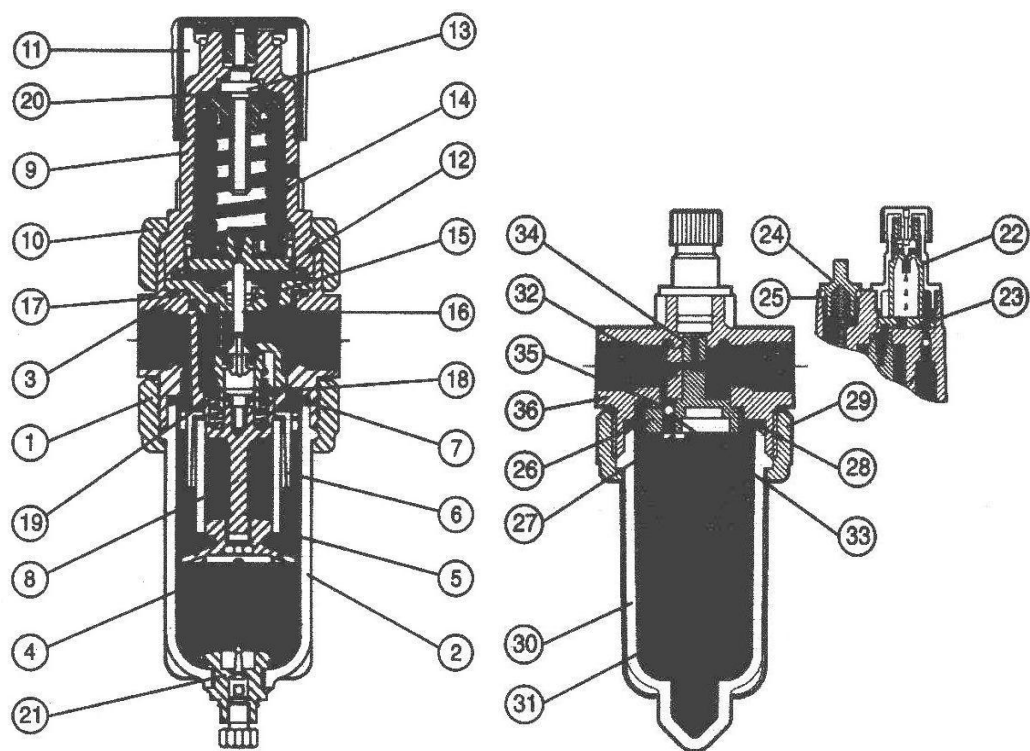
- Remover o conjunto gotejador (22) girando no sentido anti-horário.
- Remover a vedação do conjunto gotejador (23).
- Remover o plug despressurizador (24) girando no sentido anti-horário e retirar o O´ring (25).
- Lavar os componentes com água e sabão neutro e secá-los.

Montagem do conjunto do corpo (36)

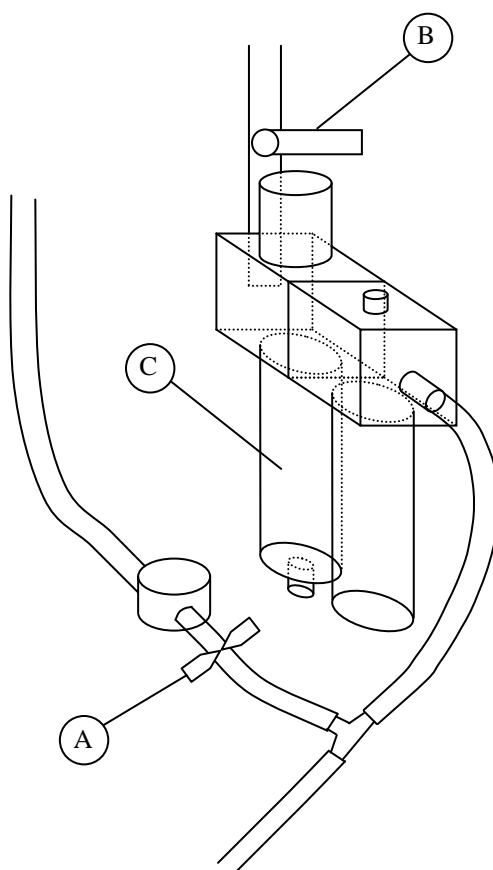
- Montar a esfera e a mola (33) no suporte do venturi (26).
- Montar a membrana (32). **Cuidado:** Os furos da membrana (32) e do suporte do venturi (26) devem estar alinhados.
- Montar o O´ring do venturi (34) e a vedação do suporte do venturi (35) no corpo do lubrificador (36).
- Montar o tubo pescador (31) no espigão dentro do corpo (36).
- Montar o anel O´ring do copo (28) no corpo (36).
- Colocar o anel de fixação (29) girando no sentido anti-horário para travar o copo (30) no corpo (36).

Montagem do conjunto gotejador (22) e do plug despressurizador (24)

- Montar a vedação do conjunto gotejador (23) no corpo do lubrificador (36). observar o posicionamento da guia de vedação.
- Montar o conjunto gotejador (22) girando no sentido horário.
- Colocar o O´ring (25) no plug despressurizador (24) e montar o conjunto no corpo do lubrificador (36) girando sentido horário.
- Reinstalar o lubrificador ao equipamento e/ou sistema pneumático.



POP 03-03	Equipamento – Filtro de ar do compressor SB-03	Procedimento – Limpeza
Materiais	Guarda-pó	
	Óculos de proteção	
<p>Nota: A referência para os sentidos horário e anti-horário é a vista de cima para baixo.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Fechar a válvula (A) da linha de água. 2) Fechar a válvula (B) da linha de ar comprimido. 3) Desenroscar os copos de polycarbonato (C). Para a desmontagem do copo, remover o colar de fixação girando-o no sentido horário. 4) Desencaixar o copo do corpo do filtro 5) Para limpar os copos de polycarbonato (C) usar somente água e sabão neutro e secá-los. 		



ANEXO II

```

C*****C
C      Programa Moisture Online Estimation - SOFT SENSE      C
C      Author: Marcelo Calide Barga                          C
C      Data: 05/07/2006                                      C
C                                                            C
C*****C

```

PROGRAM MOISTURE

IMPLICIT DOUBLEPRECISION(A-H,O-Z)

C DECLARAÇÃO DOS ARQUIVOSUTILIZADOS

CHARACTER*25 ENTRADA1,ENTRADA2,QMET,O2CONS,WMET,STOTAL,PHISOL,
* TEMPERATURA

C DECLARAÇÃO DAS MATRIZES UTILIZADAS

DIMENSION TIN(50000,21)
DIMENSION TF(50000,21)
DIMENSION T(50000,21)
DIMENSION dQ(50000,21)
DIMENSION PHIS(50000,21)
DIMENSION PHIG(50000,21)
DIMENSION PHISX(50000,21)
DIMENSION PWSAT(50000,21)
DIMENSION AWS(50000,21)
DIMENSION dO2(50000,21)
DIMENSION dW(50000,21)
DIMENSION dHSAT(50000,21)
DIMENSION S(50000,21)
DIMENSION xkla(50000,21)

C ARQUIVO DE ENTRADA DOS PARAMETROS UTILIZADOS

WRITE(*,*) 'QUAL O NOME DO ARQUIVO DOS VALORES DOS PARAMETROS?'
READ(*,10) ENTRADA1
10 FORMAT(A20)
OPEN(50,FILE=ENTRADA1,status='OLD')

C ARQUIVO DE ENTRADA DE DADOS DE TEMPERATURA TG=TS

WRITE(*,*) 'QUAL O NOME DO ARQUIVO DE DADOS EXPERIMENTAIS?'
READ(*,20) ENTRADA2
20 FORMAT(A20)
OPEN(60,FILE=ENTRADA2,status='OLD')

WRITE(*,*) 'QUAL O MÉTODO NUMÉRIO PARA CONVERGIR PHIS?'
WRITE(*,*) '1-BISSEC 2-BRUTEFORCE'
READ(*,*) CHOOSE

READ(50,*)G
READ(50,*)P
READ(50,*)Cpg
READ(50,*)Cpv

```

READ(50,*)Cps
READ(50,*)Cpw
READ(50,*)Rog
READ(50,*)Ros
READ(50,*)Rosu
READ(50,*)a1,a2
READ(50,*)b1,b2
READ(50,*)Eta
READ(50,*)C1,C2,C3
READ(50,*)C4,C5
READ(50,*)C6,C7
READ(50,*)C8,C9,C10
READ(50,*)a,b,c,d
READ(50,*)zLambda
READ(50,*)H1
READ(50,*)H2
READ(50,*)H3
READ(50,*)H4
READ(50,*)Phiso
READ(50,*)tfinal
READ(50,*)Tagita1,Tagita2,Tagita3
READ(50,*)YQ
READ(50,*)YW
READ(50,*)xMH2O
READ(50,*)xMCO2
READ(50,*)xMO2
READ(50,*)xMAR
READ(50,*)Passo
READ(50,*)Precisao
READ(50,*)PHISTOP1
READ(50,*)PHISBOT1
READ(50,*)TOL
READ(50,*)xAgua
READ(50,*)VAR

```

```

CLOSE(50)

```

C N É O CONTADOR DE LINHAS DO ARQUIVO DE ENTRADA
N=0

C T(I,1) É A COLUMNA DO ARQUIVO DE ENTRADA REFERENTE AO TEMPO EM HORAS

```

DO WHILE (.NOT.EOF(60))

```

```

N=N+1

```

```

READ(60,*)TIN(N,1),TIN(N,2),TIN(N,3),TIN(N,4),TIN(N,5)

```

```

ENDDO

```

```

CLOSE(60)

```

C FILTRO DE DADOS DE TEMPERATURA

C FILTRO 1 - ELIMINAÇÃO DE DUPLICATAS DE MEDIÇÃO EM UM MESMO TEMPO

```

K=0

```

```

DO I=1,N-1

```

```

IF (TIN(I+1,1).GT.TIN(I,1)) THEN

K=K+1

TF(K,1)=TIN(I,1)
TF(K,2)=TIN(I,2)
TF(K,3)=TIN(I,3)
TF(K,4)=TIN(I,4)
TF(K,5)=TIN(I,5)

ENDIF

ENDDO

C   FILTRO 2 - ELIMINAÇÃO DE VARIAÇÕES DA TEMPERATURA MENORES
C   QUE A PRECISÃO DOS TERMOPARES

T(1,1)=TF(1,1)
T(1,2)=TF(1,2)
T(1,3)=TF(1,3)
T(1,4)=TF(1,4)
T(1,5)=TF(1,5)

L2=0
L3=0
L4=0
L5=0

DO I=1,K-1

IF (DABS(TF(I+1,2)-TF(I-L2,2)).GE.Precisao) THEN

T(I+1,2)=TF(I+1,2)
L2=0

ELSE

T(I+1,2)=T(I,2)
L2=L2+1

ENDIF

IF (DABS(TF(I+1,3)-TF(I-L3,3)).GE.Precisao) THEN

T(I+1,3)=TF(I+1,3)
L3=0

ELSE

T(I+1,3)=T(I,3)
L3=L3+1

ENDIF

IF (DABS(TF(I+1,4)-TF(I-L4,4)).GE.Precisao) THEN

T(I+1,4)=TF(I+1,4)
L4=0

ELSE

```



```

T(I+1,4)=T(I,4)
L4=L4+1

ENDIF

IF (DABS(TF(I+1,5)-TF(I-L5,5)).GE.Precisao) THEN

T(I+1,5)=TF(I+1,5)
L5=0

ELSE

T(I+1,5)=T(I,5)
L5=L5+1

ENDIF

T(I+1,1)=TF(I+1,1)

ENDDO

C    FILTRO 3 - FILTRO EXPONENCIAL

c    DO I=1,K-1

c      TF(1,2)=T(1,2)
c      TF(1,3)=T(1,3)
c      TF(1,4)=T(1,4)
c      TF(1,5)=T(1,5)

c      TAUF=(T(I+1,1)-T(I,1))/(2*3.1415)

c      ZETA=(T(I+1,1)-T(I,1))/(TAUF+(T(I+1,1)-T(I,1)))

c      TF(I+1,2)=ZETA*T(I+1,2)+(1-ZETA)*TF(I,2)
c      TF(I+1,3)=ZETA*T(I+1,3)+(1-ZETA)*TF(I,3)
c      TF(I+1,4)=ZETA*T(I+1,4)+(1-ZETA)*TF(I,4)
c      TF(I+1,5)=ZETA*T(I+1,5)+(1-ZETA)*TF(I,5)

c      T(I+1,2)=TF(I+1,2)
c      T(I+1,3)=TF(I+1,3)
c      T(I+1,4)=TF(I+1,4)
c      T(I+1,5)=TF(I+1,5)

c    ENDDO

C    FILTRO 3 - FILTRO EXPONENCIAL DUPLO

DO I=2,K-1

TF(1,2)=T(1,2)
TF(1,3)=T(1,3)
TF(1,4)=T(1,4)
TF(1,5)=T(1,5)

TF(2,2)=T(2,2)
TF(2,3)=T(2,3)
TF(2,4)=T(2,4)

```

```

TF(2,5)=T(2,5)

TAUF=0.1
c  TAUF=(T(I+1,1)-T(I,1))/(2*3.1415)

ZETA=(T(I+1,1)-T(I,1))/(TAUF+(T(I+1,1)-T(I,1)))

TF(I+1,2)=(ZETA**2)*T(I+1,2)+2*(1-ZETA)*TF(I,2)-((1-ZETA)**2)
*TF(I-1,2)
TF(I+1,3)=(ZETA**2)*T(I+1,3)+2*(1-ZETA)*TF(I,3)-((1-ZETA)**2)
*TF(I-1,3)
TF(I+1,4)=(ZETA**2)*T(I+1,4)+2*(1-ZETA)*TF(I,4)-((1-ZETA)**2)
*TF(I-1,4)
TF(I+1,5)=(ZETA**2)*T(I+1,5)+2*(1-ZETA)*TF(I,5)-((1-ZETA)**2)
*TF(I-1,5)

T(I+1,2)=TF(I+1,2)
T(I+1,3)=TF(I+1,3)
T(I+1,4)=TF(I+1,4)
T(I+1,5)=TF(I+1,5)

ENDDO

C  FILTRO 4 - MÉDIA MÓVEL

M=0

WRITE(*,*) K
PAUSE

DO I=1,K

M=M+1

IF (M.EQ.11) THEN

T(M,2)=(T(M-1,2)+T(M-2,2)+T(M-3,2)+T(M-4,2)+T(M-5,2)+T(M-6,2)
*+T(M-7,2)+T(M-8,2)+T(M-9,2)+T(M-10,2))/10.

T(M,3)=(T(M-1,3)+T(M-2,3)+T(M-3,3)+T(M-4,3)+T(M-5,3)+T(M-6,3)
*+T(M-7,3)+T(M-8,3)+T(M-9,3)+T(M-10,3))/10.

T(M,4)=(T(M-1,4)+T(M-2,4)+T(M-3,4)+T(M-4,4)+T(M-5,4)+T(M-6,4)
*+T(M-7,4)+T(M-8,4)+T(M-9,4)+T(M-10,4))/10.

T(M,5)=(T(M-1,5)+T(M-2,5)+T(M-3,5)+T(M-4,5)+T(M-5,5)+T(M-6,5)
*+T(M-7,5)+T(M-8,5)+T(M-9,5)+T(M-10,5))/10.

ENDIF

ENDDO

WRITE(*,*) 'ARQUIVO DE SAIDA PARA CALOR METABOLICO? (Q)'
READ(*,105) QMET
WRITE(*,*) 'ARQUIVO DE SAIDA PARA OXIGENIO COMSUMIDO? (O2)'
READ(*,105) O2CONS
WRITE(*,*) 'ARQUIVO DE SAIDA PARA AGUA METABOLICA? (W)'
READ(*,105) WMET
WRITE(*,*) 'ARQUIVO DE SAIDA PARA MASSA TOTAL DE SOL. SECOS?(S)'
READ(*,105) STOTAL

```

```

WRITE(*,*) 'ARQUIVO DE SAIDA PARA UMIDADE DA FASE SOLIDA?(PHIS)'
READ(*,105) PHISOL
WRITE(*,*) 'ARQUIVO DE SAIDA PARA TEMPERATURA?(T)'
READ(*,105) TEMPERATURA

105  FORMAT(A20)

      OPEN(1,FILE=QMET,status='unknown')
      OPEN(2,FILE=O2CONS,status='unknown')
      OPEN(3,FILE=WMET,status='unknown')
      OPEN(4,FILE=STOTAL,status='unknown')
      OPEN(5,FILE=PHISOL,status='unknown')
      OPEN(6,FILE=TEMPERATURA,status='unknown')

      WRITE(1,100)
100  FORMAT(2X,'tempo',5X,'dQMET1',6X,'dQMET2',6X,'dQMET3 ')
      WRITE(1,110)
110  FORMAT(3X,'(h)',5X,'(J/m3.h)',4X,'(J/m3.h)',4X,'(J/m3.h)')

      WRITE(2,120)
120  FORMAT(2X,'tempo',7X,'dO2-1',11X,'dO2-2',11X,'dO2-2')
      WRITE(2,130)
130  FORMAT(3X,'(h)',5X,'(molO2/m3.h)',4X,'(molO2/m3.h)',4X,
*    '(molO2/m3.h)')

      WRITE(3,140)
140  FORMAT(2X,'tempo',5X,'dWMET1',6X,'dWMET2',6X,'dWMET3')
      WRITE(3,150)
150  FORMAT(3X,'(h)',5X,'(kg/m3.h)',4X,'(kg/m3.h)',4X,'(kg/m3.h)')

      WRITE(4,160)
160  FORMAT(2X,'tempo',8X,'STOTAL1',12X,'STOTAL2',12X,'STOTAL3')
      WRITE(4,180)
180  FORMAT(3X,'(h)',7X,'(kg-sol-tot/m3)',5X,'(kg-sol-tot/m3)',5X,
*    '(kg-sol-tot/m3)')

      WRITE(5,190)
190  FORMAT(2X,'tempo',8X,'PHIS1',12X,'PHIS2',12X,'PHIS3')
      WRITE(5,200)
200  FORMAT(3X,'(h)',7X,'(kg-água/kg-sol-tot)',5X,
*    '(kg-água/kg-sol-tot)',5X,'(kg-água/kg-sol-tot)')

      WRITE(6,210)
210  FORMAT(2X,'tempo',5X,'T1',5X,'T2',5X,'T3',5X,'TAR')

      DO I=1,K-1

      DO J=2,4

C      CÁLCULO DE PWSAT PARA CADA TEMPERATURA E POSIÇÃO

      PWSAT(I,J)=d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c)))

      PWSAT(I,5)=d*DEXP(a-(b/(T(I,5)+c)))

C      VALORES DE UMIDADE DO AR E DA TEMPERATURA DO AR DE ENTRADA
      PHIG(I,5)=(xMH2O/xMAR)/((P/PWSAT(I,5))-1)

c      PHIG(I,5)=0.034

```

```

C      VALORES INICIAIS DE PHIS E S

      IF (T(I,1).EQ.0.0) THEN

        PHIS(I,J)=Phiso

        S(I,J)=(1./(1.+Phiso))*(1.-Eta)*Rosu

        dQ(I,J)=0.0
        dO2(I,J)=0.0
        dW(I,J)=0.0

      ENDIF

C      EVENTO DE AGITAÇÃO - MEDIA PONDERADA DA UMIDADE EM RELAÇÃO A ALTURA

      IF (T(I,1).EQ.Tagita1) THEN

        PHIS(I,J)=((PHIS(I,2)*(H1-0.)+PHIS(I,3)*(H2-H1)
*      +PHIS(I,4)*(H3-H2))/(H3)))+(xAgua/S(I,J)*(H3*0.7*0.6))

c      PHIS(I,4)=(PHIS(I,3)*(H2-H1)
c      *      +PHIS(I,4)*(H3-H2))/(H3-H1)

c      PHIS(I,3)=(PHIS(I,3)*(H2-H1)
c      *      +PHIS(I,4)*(H3-H2))/(H3-H1)

c      PHIS(I,2)=PHIS(I,2)

      ENDIF

      IF (T(I,1).EQ.Tagita2) THEN

        PHIS(I,J)=((PHIS(I,2)*(H1-0.)+PHIS(I,3)*(H2-H1)
*      +PHIS(I,4)*(H3-H2))/(H3)))+(xAgua/S(I,J)*(H3*0.7*0.6))

      ENDIF

      IF (T(I,1).EQ.Tagita3) THEN

        PHIS(I,J)=((PHIS(I,2)*(H1-0.)+PHIS(I,3)*(H2-H1)
*      +PHIS(I,4)*(H3-H2))/(H3)))+(xAgua/S(I,J)*(H3*0.7*0.6))

      ENDIF

C      ISOTERMA CALÇADA

        AWS(I,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I,J)**(C3+C4*T(I,J))
*      *DEXP(C1+C2*T(I,J))))*(1./C5)

C      ISOTERMA HANDERSON
c      AWS(I,J)=1-DEXP(-(PHIS(I,J)**C7)*C6*T(I,J))

c      ISOTERMA HALSEY MODIFICADA

c      AWS(I,J)=DEXP((-DEXP(C8*T(I,J)+C10))/(PHIS(I,J)**C9))

```

```

C      CALCULO DE PHIG A PARTIR DE AWS E PWSAT

      PHIG(I,J)=(0.62413*AWS(I,J)*PWSAT(I,J))/(P-AWS(I,J)*PWSAT(I,J))

C      CALCULO DE PHISX A PARTIR DE AWS, T(Z)

C      PHISX(I,J)=((DLOG(1-AWS(I,J)**(C5)))/(-DEXP(C1+C2*T(I,J))))
C      *      *(1/(C3+C4*T(I,J)))

C      CALCULO DE KLA A PARTIR DE T(Z) E PHIS

c      xkla(I,J)=(a1+a2*(T(I,J)+273.))*PHIS(I,J)-(b1+b2*(T(I,J)+273.))

C      CALCULO DOS PARAMETROS PARA O BALANÇO DE ENERGIA

      ALFA=Cpg+PHIG(I,J)*Cpv

      BETA=Cps+PHIS(I,J)*Cpw

c      DELTA=zLambda*xkla(I,J)*(PHIS(I,J)-PHISX(I,J))*3600.

C      CÁLCULO DE dHSAT (LIVRO DAVID - CAP.21

      dHSAT(I,J)=(0.6413*b*P)/(((T(I,J)+c)**2.)*
      *      (((P/(d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c)))))-1)**2)*d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c))))

C      CALCULO DO CALOR METABÓLICO (Q) EM CADA POSIÇÃO DO BIORREATOR
C      J=2,5 PRIMEIRO TERMOPAR

      IF (J.LE.2) THEN

      DELTA=G*zLambda*dHSAT(I,J)*(T(I,J)-T(I,5))/(2*(H1-0.))

      dQ(I+1,J)=(ALFA*Eta*Rog+S(I,J)*BETA)*(T(I+1,J)-T(I,J))/
      *      (1*(T(I+1,1)-T(I,1)))+(ALFA*G)*(T(I,J)-T(I,5))/
      *      (1*(H1-0.))+DELTA

      ELSE

C      J=5,9 SEGUNDO TERMOPAR

      IF (J.LE.3) THEN

      DELTA=G*zLambda*dHSAT(I,J)*(T(I,J)-T(I,J-1))/(2*(H2-H1))

      dQ(I+1,J)=(ALFA*Eta*Rog+S(I,J)*BETA)*(T(I+1,J)-T(I,J))/
      *      (1*(T(I+1,1)-T(I,1)))+(ALFA*G)*(T(I,J)-T(I,J-1))/
      *      (1*(H2-H1))+DELTA

      ELSE

C      J=9,13 TERCEIRO TERMOPAR

      IF (J.LE.4) THEN

      DELTA=G*zLambda*dHSAT(I,J)*(T(I,J)-T(I,J-1))/(2*(H3-H2))

```

```

      dQ(I+1,J)=(ALFA*Eta*Rog+S(I,J)*BETA)*(T(I+1,J)-T(I,J))/
*      (1*(T(I+1,1)-T(I,1)))+(ALFA*G)*(T(I,J)-T(I,J-1))/
*      (1*(H3-H2))+DELTA

      ENDIF
      ENDIF
      ENDIF

C  DEVIDO A NÃO HOMOGENEIDADE DA TEMPERATURA INICIAL NAS DIVERSAS POSIÇÕES
C  ACABA PROVOCANDO UMA INCONSISTÊNCIA POIS ACABA OBTENDO UM dQ<0.

      IF (dQ(I+1,J).LT.0.0) THEN

      dQ(I+1,J)=0.0

      ENDIF

C  CALCULO DO CONSUMO DE O2 A PARTIR DO CALOR METABÓLICO PRODUZIDO
      dO2(I+1,J)=(1./YQ)*dQ(I+1,J)

C  CALCULO DA ÁGUA PRODUZIDA A PARTIR DO CONSUMO DE O2
      dW(I+1,J)=(YW)*dO2(I+1,J)*xMH2O

C  CALCULO DA VARIAÇÃO DE SOLIDOS TOTAIS SECOS SEGUNDO MORTEZA

      S(I+1,J)=- (YW*xMH2O+xMCO2-xMO2)*dO2(I+1,J)*(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
*      +S(I,J)

C  WRITE (*,*) S(I,J), S(I+1,J), PHIS(I,J), PHISX(I,J), PHIG(I,J),
C  *  AWS(I,J), xKla(I,J), ALFA, BETA, DELTA, dQ(I+1,J), dO2(I+1,J),
C  *  dW(I+1,J)

C  ESTIMAÇÃO DE PHIS NAS DIVERSAS POSIÇÕES UTILIZANDO O
C  O MÉTODO DA BISSECÇÃO OU NEWTON

      IF (CHOOSE.EQ.1.) THEN

      IF (J.LE.2) THEN

      PWSAT(I,J)=d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c)))

      PHISTOP=PHISTOP1
      PHISBOT=PHISBOT1

      XM=PHIS(I,J)

70    PHIS(I+1,J)=PHISTOP

      AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
*      *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

      PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
*      /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

      R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,5))/(1*(H1-0.))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
*      -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

```

```

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* +dW(I+1,J)

FTOP=R1-R2

PHIS(I+1,J)=PHISBOT

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
* *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
* /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,5))/(1*(H1-0.))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
* -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* +dW(I+1,J)

FBOT=R1-R2

c PHIS(I+1,J)=PHISBOT

PHIS(I+1,J)=XM

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
* *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
* /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,5))/(1*(H1-0.))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
* -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* +dW(I+1,J)

FXM=R1-R2

IF (DABS(FXM).GT.TOL) THEN

IF (FXM*FTOP.LT.0.0) THEN

PHISBOT=XM

XM=(PHISTOP*DABS(FBOT)+PHISBOT*DABS(FTOP))/(DABS(FTOP)+DABS(FBOT))

GOTO 70

ELSE

PHISTOP=XM

XM=(PHISTOP*DABS(FBOT)+PHISBOT*DABS(FTOP))/(DABS(FTOP)+DABS(FBOT))

```

```

GOTO 70

ENDIF

ENDIF

ELSE

IF (J.LE.3) THEN

PWSAT(I,J)=d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c)))

PHISTOP=PHISTOP1
PHISBOT=PHISBOT1

XM=PHIS(I,J)
80  PHIS(I+1,J)=PHISTOP

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
* *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
* /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(1*(H2-H1))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
* -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* +dW(I+1,J)

FTOP=R1-R2

PHIS(I+1,J)=PHISBOT

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
* *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
* /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(1*(H2-H1))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
* -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* +dW(I+1,J)

FBOT=R1-R2

c  PHIS(I+1,J)=PHISBOT

PHIS(I+1,J)=XM

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
* *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

```



```

*      /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(1*(H2-H1))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
*      -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
*      -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
*      +dW(I+1,J)

FXM=R1-R2

IF (DABS(FXM).GT.TOL) THEN

IF (FXM*FTOP.LT.0.0) THEN

PHISBOT=XM

XM=(PHISTOP*DABS(FBOT)+PHISBOT*DABS(FTOP))/(DABS(FTOP)+DABS(FBOT))

GOTO 80

ELSE

PHISTOP=XM

XM=(PHISTOP*DABS(FBOT)+PHISBOT*DABS(FTOP))/(DABS(FTOP)+DABS(FBOT))

GOTO 80

ENDIF

ENDIF

ELSE

IF (J.LE.4) THEN

PWSAT(I,J)=d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c)))

PHISTOP=PHISTOP1
PHISBOT=PHISBOT1

XM=PHIS(I,J)

90    PHIS(I+1,J)=PHISTOP

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
*      *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
*      /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(1*(H3-H2))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
*      -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
*      -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
*      +dW(I+1,J)

```

```

FTOP=R1-R2

PHIS(I+1,J)=PHISBOT

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
* *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
* /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(1*(H3-H2))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
* -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* +dW(I+1,J)

FBOT=R1-R2

c PHIS(I+1,J)=PHISBOT

PHIS(I+1,J)=XM

AWS(I+1,J)=VAR*(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
* *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)

PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
* /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(1*(H3-H2))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
* -PHIG(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))

R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(1*(T(I+1,1)-T(I,1)))
* +dW(I+1,J)

FXM=R1-R2

IF (DABS(FXM).GT.TOL) THEN

IF (FXM*FTOP.LT.0.0) THEN

PHISBOT=XM

XM=(PHISTOP*DABS(FBOT)+PHISBOT*DABS(FTOP))/(DABS(FTOP)+DABS(FBOT))

GOTO 90

ELSE

PHISTOP=XM

XM=(PHISTOP*DABS(FBOT)+PHISBOT*DABS(FTOP))/(DABS(FTOP)+DABS(FBOT))

GOTO 90

ENDIF

ENDIF

```

[illegible]

```

c      ENDIF
c      ENDIF

C      WRITE(*,*) 'TERMO1 ',(R1-R2) , 'PHIS(I+1,2)', PHIS(I+1,J)

c      ELSE

c      IF (J.LE.3) THEN

c      PWSAT(I,J)=d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c)))

c      PHIS(I+1,J)=PHIS(I,J)

c380    K2=1.

c      AWS(I+1,J)=(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
c      *
*      *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))**(1./C5)

C      AWS(I+1,J)=1-DEXP(-(PHIS(I+1,J)**C7)*C6*T(I+1,J))

C      AWS(I+1,J)=DEXP((-DEXP(C8*T(I+1,J)+C10))/(PHIS(I+1,J)**C9))

c      PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
c      *
*      /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))

c      R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(2*(H2-H1))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
c      *
*      -PHIG(I,J))/(2*(T(I+1,1)-T(I,1)))
c
c      R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(2*(T(I+1,1)-T(I,1)))
c      *
*      -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(2*(T(I+1,1)-T(I,1)))
c      *
*      +dW(I+1,J)

c      IF (DABS(R1-R2).GT.0.001) THEN

c      IF (DABS(R1-R2).LE.0.1) THEN
c      K2=K2+99.
c      ENDIF

c      IF (R1.GT.R2) THEN

c      PHIS(I+1,J)=PHIS(I+1,J)-(Passo/DFLOAT(K2))

c      GOTO 380

c      ELSE

c      PHIS(I+1,J)=PHIS(I+1,J)+(Passo/DFLOAT(K2))

c      GOTO 380

c      ENDIF
c      ENDIF
c
C      WRITE(*,*) 'TERMO2 ',(R1-R2) , 'PHIS(I+1,3)', PHIS(I+1,J)

c      ELSE

```

```

c      IF (J.LE.4) THEN
c
c      PWSAT(I,J)=d*DEXP(a-(b/(T(I,J)+c)))
c
c      PHIS(I+1,J)=PHIS(I,J)
c390   K3=1.
c
c      AWS(I+1,J)=(1-DEXP(-PHIS(I+1,J)**(C3+C4*T(I+1,J))
c      *   *DEXP(C1+C2*T(I+1,J))))*(1./C5)
C      AWS(I+1,J)=1-DEXP(-(PHIS(I+1,J)**C7)*C6*T(I+1,J))
c
c      AWS(I+1,J)=DEXP((-DEXP(C8*T(I+1,J)+C10))/(PHIS(I+1,J)**C9))
c
c      PHIG(I+1,J)=(0.62413*AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
c      *   /(P-AWS(I+1,J)*PWSAT(I+1,J))
c
c      R1=G*(PHIG(I,J)-PHIG(I,J-1))/(2*(H3-H2))+Eta*Rog*(PHIG(I+1,J)
c      *   -PHIG(I,J))/(2*(T(I+1,1)-T(I,1)))
c
c      R2=-S(I,J)*(PHIS(I+1,J)-PHIS(I,J))/(2*(T(I+1,1)-T(I,1)))
c      *   -PHIS(I,J)*(S(I+1,J)-S(I,J))/(2*(T(I+1,1)-T(I,1)))
c      *   +dW(I+1,J)
c
c      IF (DABS(R1-R2).GT.0.001) THEN
c
c      IF (DABS(R1-R2).LE.0.1) THEN
c      K3=K3+99.
c      ENDIF
c
c      IF (R1.GT.R2) THEN
c
c      PHIS(I+1,J)=PHIS(I+1,J)-(Passo/DFLOAT(K3))
c
c      GOTO 390
c
c      ELSE
c
c      PHIS(I+1,J)=PHIS(I+1,J)+(Passo/DFLOAT(K3))
c
c      GOTO 390
c
c      ENDIF
c      ENDIF
C      WRITE(*,*) 'TERMO3 ',(R1-R2) , ' PHIS(I+1,4)', PHIS(I+1,J)
c
c      ENDIF
c      ENDIF
c      ENDIF
c
c      ENDIF

```

